

Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Petra Keul

aus Bonn

Januar 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pathophysiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: * Levkau

2. Gutachter: * Fischer

3. Gutachter: * Ergün

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: * Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2010

Für Mama und Papa

*Es gibt nichts Schöneres, als geliebt zu werden,
geliebt um seiner selbst willen oder vielmehr trotz seiner selbst.*

~Victor Hugo~

Inhaltsverzeichnis	I
--------------------	---

Abkürzungsverzeichnis	VI
-----------------------	----

1	Einleitung	1
1.1	Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	1
1.1.1	Struktur und Synthese	1
1.1.2	Bioverfügbarkeit und Präsentation von S1P	2
1.1.3	Biologische Funktionen	3
1.1.3.1	Immunität	3
1.1.3.2	Angiogenese	4
1.1.3.3	Entzündung	5
1.2	S1P-Rezeptoren und Signaltransduktion	6
1.2.1	Allgemeines	6
1.2.2	S1P ₁ (Edg1)	8
1.2.3	S1P ₂ (Edg5)	9
1.2.4	S1P ₃ (Edg3)	9
1.2.5	S1P ₄ (Edg6)	10
1.2.6	S1P ₅ (Edg8)	10
1.3	S1P und dessen Rezeptoren im Kontext der Atherosklerose	10
1.3.1	Atherosklerose	10
1.3.2	S1P Wirkungen in der Gefäßwand	15
1.3.2.1	S1P Wirkungen auf das Endothel	15
1.3.2.2	S1P Wirkungen auf vaskuläre glatten Muskelzellen (VSMC)	16
1.3.2.3	S1P Wirkungen auf Makrophagen	17
1.4	S1P in der Atherosklerose: Pro- oder anti-atherosklerotisch ?	17
1.5	S1P-Agonisten als Medikamente in der Transplantation und bei Multipler Sklerose	18

1.6	Fragestellung und Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2	Zellkulturprodukte	23
2.1.3	Medien und Lösungen für die Zellkultur	24
2.1.4	Reagenzsysteme	25
2.1.5	Plastikwaren / Verbrauchswaren	25
2.1.6	Lösungen und Puffer	26
2.1.7	Tierfutter	27
2.1.8	Antikörper	28
2.1.9	Geräte	29
2.1.10	Mausstämme	30
2.1.11	Zelllinien	30
2.1.12	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Blutanalysen	31
2.2.2	FTY720 Fütterung	31
2.2.3	Quantifizierung von atherosklerotischen Läsionen in der BCA und der Aortenwurzel	31
2.2.4	Histologie	32
2.2.4.1	Hämalaun & Eosin (H&E)	32
2.2.4.2	Sirius Rot	32
2.2.5	Immunhistochemie	32
2.2.5.1	Makrophagen Färbung (Mac-2)	33
2.2.5.2	Glatte Muskelzellen (SMC)	33
2.2.5.3	T-Lymphozyten (CD3)	33
2.2.5.4	Macrophage Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)	33
2.2.6	Zellkultur	34
2.2.6.1	Beschichten von Membranen und Zellkulturschalen mit Vitrogen100	34
2.2.6.2	Kultivierung von glatten Muskelzellen (Maus und Ratte)	34
2.2.6.3	Kultivierung von Endothelzellen der Nabelschur (HUVEC)	34
2.2.6.4	SMC Präparation von der Maus	35

Inhaltsverzeichnis

2.2.6.5 Migration (Boyden Kammer)	35
2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)	36
2.2.8 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.8.1 Gewinnung von genomischer DNA aus dem Blut	37
2.2.8.2 RNA Präparation	37
2.2.8.3 Reverse Transkription	37
2.2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.8.5 Primer	38
2.2.8.6 Agarosegele	39
2.2.8.7 Real Time PCR	39
2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) für Proteine	40
2.2.9.1 Proteinbestimmung	40
2.2.9.2 SDS-Gele	40
2.2.9.3 SDS-Gelelektrophorese	40
2.2.10 Western Blot	41
2.2.11 Messung von MCP-1	42
2.2.12 Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen	42
2.2.13 S1P-Bestimmung im Peritoneal-Exsudat	43
2.2.14 Knochenmarks-Transplantation	43
3 Ergebnisse	45
3.1 Das S1P-Analog FTY720 inhibiert die Atherosklerose in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (ApoE ^{-/-})	45
3.1.1 FTY720 verringert die Größe der atherosklerotischen Läsion und verändert ihre zelluläre Zusammensetzung	45
3.2 Potentielle anti-atherogene Mechanismen von S1P und FTY720: Stimulation von eNOS und Inhibition von MCP-1	50
3.2.1 FTY720 stimuliert die NO Produktion durch Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS)	50
3.2.2 FTY720 inhibiert die Produktion des pro-atherogenen Chemokins <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (MCP-1)	55
3.3 S1P ₃ Defizienz inhibiert die Rekrutierung inflammatorischer Makrophagen in die atherosklerotische Läsion und in das entzündlich veränderte Peritoneum	58

3.3.1	S1P ₃ Defizienz verändert die Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen	58
3.3.2	S1P ₃ ^{-/-} Makrophagen haben einen Defekt in der Rekrutierung bei Peritonitis	60
3.3.3	Das Fehlen des S1P ₃ -Rezeptors in hämatopoetischen Zellen beeinträchtigt die Rekrutierung von Makrophagen in die atherosklerotische Läsion: Studien in hämatopoetischen Chimären	63
4	Diskussion	66
5	Zusammenfassung und Ausblick	74
6	Literatur	76
7	Anhang	
	Danksagung	
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Erklärung	
	Paper	

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest	deionisiertes Wasser
A. bidest	doppelt deionisiertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FITC	<i>Fluorescein-Isothiocyanat</i>
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
HDL	High Density Lipoproteins
h	Stunde (n)
LDL	Low Density Lipoproteins
l	Liter
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mm	Millimeter
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mM	Millimolar
M	Molar
nm	Nanometer
Neg. Kontrolle	Negativ Kontrolle
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)

Abkürzungen

PE	R-Phycoerythrin
pH	`potentia hydrogenii` , Säurestärke
PBS	Phosphat gepufferte Saline
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.g.	so genannt (e)
sec	Sekunde(n)
SMC	(Smooth Muscle Cells) glatte Muskelzellen
Sek. AB	Sekundärer Antikörper
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
VSMC	(Vascular Smooth Muscle Cells) vaskuläre glatte Muskelzellen
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

1.1.1 Struktur und Synthese

Die Substanzklasse der Sphingolipide besteht aus mehr als 300 strukturell verwandten Lipiden, deren Vertreter in allen Zelltypen von Menschen, Pflanzen und Hefen zu finden sind ^{1,2}. Benannt wurde sie nach dem Sphingomyelin, das 1884 vom deutschen Naturforscher Johann L.W. Thudichum als Bestandteil der grauen und weißen Hirnmasse beschrieben wurde ³. Fasziniert davon, dass sich das Molekül keiner der bis dahin bekannten Substanzklassen zuordnen ließ, wählte Thudichum das Präfix „Sphingo“ in Anlehnung an die geheimnisvolle Sphinx der griechischen Mythologie. Der Begriff „Sphingolipide“ für alle strukturell verwandten Lipide wurde dann von Carter und Kollegen 1942 eingeführt ⁴.

Sphingomyelin ist die Vorläufersubstanz für die wichtige Unterklasse der Sphingolipide, den so genannten Sphingomyelin-Metaboliten, zu denen das in dieser Arbeit behandelte Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gehört. Sphingomyelin wird über Sphingomyelinasen zu Ceramid umgewandelt, dessen Abkömmling Sphingosin durch die Sphingosin-Kinasen 1 und -2 zu S1P phosphoryliert wird. Während S1P-Phosphatasen S1P wieder zu Sphingosin abbauen können, spaltet die Lyase S1P irreversibel zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin (Abb. 1).

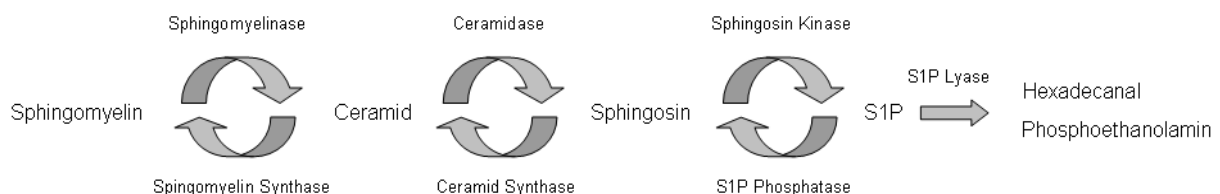


Abbildung 1: Bildung von S1P über Sphingomyelin, Ceramid und Sphingosin

Jahrzehntelang galt S1P als bloßes Zwischenprodukt des Sphingosin-Abbaus und struktureller Bestandteil biologischer Membranen. Das änderte sich schlagartig als

vor 20 Jahren entdeckt wurde, dass S1P intrazelluläre Signaltransduktion auslösen kann und dass es eigene, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzt. Das führte zu einem explosionsartig gestiegenem Interesse an diesem Molekül und der nachfolgenden Erkenntnis, dass S1P eine Schlüsselposition bei so fundamentalen zellulären Prozessen wie Zellwachstum^{5,6}, Angiogenese, Gefäßreifung,⁷⁻⁹ Immunität^{10,11} und Herzentwicklung¹² einnimmt.

1.1.2 Bioverfügbarkeit und Präsentation von S1P

Die Hauptquelle von S1P im Plasma sind vor allem Erythrozyten, obwohl aktivierte Thrombozyten, Mastzellen und Leukozyten, aber auch vaskuläre und lymphatische Endothelzellen dazu beitragen können^{13,14}. Innerhalb der Zelle bewegt sich S1P frei zwischen den verschiedenen Membranen, benötigt aber spezielle Transport-Mechanismen für die Translokation zur äußeren Schicht der zytoplasmatischen Membran^{15,16}. Über diese Transportmechanismen ist für die meisten Zelltypen bis heute nichts bekannt, nur bei Thrombozyten und Mastzellen sind die Transporter des ABC-Typs mit dem Export von S1P aus der Zelle in Verbindung gebracht worden^{17,18}. Es müssen allerdings andere Mechanismen ausschlaggebend für den Export von S1P ins Plasma sein, da die S1P Plasma-Spiegel von Knockout Mäusen für die ABCA1-, ABCA7-, und ABCC1-Transporter nicht verändert sind¹⁹. Die Plasma-Konzentrationen von S1P liegen zwischen 200 und 1000 nM²⁰, was in etwa 20-100-fach höher als die K_d der S1P-Rezeptoren ist^{11,21}. Der biologisch aktive Teil davon beträgt allerdings lediglich 1-2%. Der Großteil des S1P im Plasma ist an High Density Lipoproteinen (HDL) (50-70%) gebunden, während der Rest mit Albumin (~30%), Low Density Lipoproteinen (LDL) und Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) (<10%) assoziiert ist²¹. Da die Bindungsaffinität von S1P zu HDL im Plasma sehr hoch ist²², besteht eine positive Korrelation zwischen dem Plasma-Spiegel von S1P und HDL-Cholesterin (HDL-C) sowie der HDL-Apolipoproteine AI und AII²⁰. Das mit HDL assoziierte S1P ist biologisch aktiv, da viele der HDL-vermittelten Effekte ganz oder teilweise dem darin enthaltenen S1P zugeschrieben werden können. Dazu zählen Stickstoffmonoxid-abhängige Vasodilatation, endotheliale Angiogenese und bestimmte Aspekte der anti-oxidativen, anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Effekte von HDL²³. Wie das in HDL „gelagerte“ S1P seinen Rezeptoren präsentiert wird ist nicht endgültig geklärt und bis heute Gegenstand der

Forschung. Fest steht, dass es ein selektiver und regulierter Prozess sein muss, da die Bindung von HDL an eigene Rezeptoren erfolgen muss, um die durch HDL induzierte Aktivierung von S1P-Rezeptoren zu gewährleisten²⁴⁻²⁷. Somit wäre die Aktivierung von S1P-Rezeptoren durch HDL durch mehrere komplexe Mechanismen gesteuert: 1) das Verteilungs- und Expressionsmuster von HDL- und S1P-Rezeptoren, 2) die Menge an S1P, die ein einzelnes HDL-Partikel trägt, und 3) dem HDL-Spiegel im Plasma. Diese Hypothese konnte kürzlich mit der Beobachtung untermauert werden, dass die künstliche Beladung von HDL-Partikeln mit S1P ihre Fähigkeit, die von oxidiertem LDL (ox-LDL) induzierte Apoptose in Endothelzellen zu inhibieren, erhöht²².

1.1.3 Biologische Funktionen

1.1.3.1 Immunität

Der Großteil der Erkenntnisse über S1P-vermittelte Signalübertragung stammt aus Studien, die sich primär mit dem Immunsystem beschäftigen haben. So ist S1P für die Lymphozyten-Rezirkulation essentiell, da es von B- und T-Zellen für das Verlassen von sekundären lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten) benötigt wird²⁸. Dazu wandern Lymphozyten entlang eines S1P-Gradienten vom Lymphknoten (S1P-Konzentrationen im femtomolaren Bereich) über die Lymphflüssigkeit (S1P-Konzentrationen im pikomolaren Bereich) zum Plasma (mikromolare S1P-Konzentrationen). Wird dieser Gradient durch pharmakologische oder genetische Eingriffe aufgehoben oder gestört, können Lymphozyten die sekundären lymphatischen Organe nicht mehr verlassen, was sich in einer peripheren Lymphopenie widerspiegelt²⁹. Studien mit genetischer Deletion des S1P₁ Rezeptors oder S1P₁ Agonisten/Antagonisten haben stichhaltige Beweise dafür geliefert, dass es dieser Rezeptor ist, der den Austritt von Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen vermittelt. Allerdings vermögen nur S1P₁ Agonisten und nicht Antagonisten eine Lymphopenie auszulösen, was mechanistisch für eine initiale Aktivierung des S1P₁-Rezeptors mit anschließender Herunterregulation statt einer klassischen Inhibition als Wirkprinzip spricht^{28, 29}. Dieser Erkenntnis bediente sich die in den letzten Jahren von der Pharma-Industrie rasant vorangetriebene Entwicklung synthetischer S1P Analoga, die viel versprechende Ansätze für neue

immunsuppressive Therapien in der Transplantationsmedizin und bei der Behandlung von Multipler Sklerose liefern³⁰.

1.1.3.2 Angiogenese

In Endothelzellen hat S1P viele verschiedene Effekte, welche die Gefäßreifung und -Morphogenese direkt betreffen. Dazu zählen die Stimulation der endothelialen Proliferation und Migration, die Induktion von Angiogenese, der Schutz vor Apoptose im Endothel und die Kontrolle der Gefäßpermeabilität durch S1P^{31, 32}. *In vitro* Experimente zeigten, dass S1P nicht nur die Proliferation von Endothelzellen induziert, sondern auch eine sehr potente chemotaktische Wirkung auf sie hat³³. Darüber hinaus fördert es die zielgerichtete Migration, die Gefäßdifferenzierung und die Ausbildung kapillarer Netzwerke⁸. Dabei spielen die kleinen GTPasen Rac1 und RhoA eine wichtige Rolle: Die Aktivierung von Rac1 durch den S1P₁-Rezeptor führt zu einer Induzierung der fokalen Kontakte, einem *membrane ruffling* und zur kortikalen Aktin-Formation, während die Aktivierung von RhoA durch S1P₃ den Aufbau von Stress-Fasern fördert. Im Gegensatz zu S1P₁ und S1P₃ scheint der S1P₂-Rezeptor anti-migratorische und anti-angiogene Effekte zu vermitteln. Die pharmakologische Blockade des S1P₂ in Endothelzellen verstärkt die über S1P₁ ausgelöste pro-migratorische Wirkung von S1P, während dessen Überexpression die S1P-induzierte Migration durch Inhibition von Rac1 hemmt³⁴. Diese Effekte finden ihre Bestätigung *in vivo*, wo S1P eine wichtige Rolle bei der Gefäßreifung spielt. Speziell der S1P₁-Rezeptor ist dabei involviert, da sowohl der systemische S1P₁ Knockout als auch der Endothelzell-spezifische Knockout zur intrauterinen Letalität aufgrund defekter Gefäßreifung mit Gefäßrupturen führt^{7, 35}. Einen identischen Phänotyp zeigen Mäuse, die für die beiden S1P-produzierenden Enzyme Sphk1 und Sphk2 defizient sind³⁶. Neben S1P₁ spielen auch S1P₂ und S1P₃ eine Rolle in der Gefäßreifung, da Doppel- und Tripel-Knockouts zusätzliche Defekte in der Gefäßbildung offenbaren³⁷. Doch nicht nur während der Gefäßentwicklung, sondern auch in der Tumor-assoziierten Angiogenese scheint S1P eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte in verschiedenen Xenograft- und Allograft-Modellen gezeigt werden, dass S1P für das Tumorwachstum benötigt wird, da die Gabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen S1P die Tumorgöße entscheidend reduzieren konnte³⁸. Dieser Effekt wurde der Inhibition der Tumor-Angiogenese aber auch

direkten Effekten auf Tumorzellen zugeschrieben³⁸. Der gleiche anti-S1P Antikörper inhibierte in einer anderen Studie die Migration und die Kapillar-Formation von Endothelzellen sowie die Wachstumsfaktor-induzierte Gefäßbildung *in vitro* und verhinderte die Neovaskularisierung der Retina bei der Sauerstoff-induzierten ischämischen Retinopathie *in vivo*³⁹.

1.1.3.3 Entzündung

Welche Rolle S1P bei Entzündung spielt, ist lange nicht klar gewesen und immer noch Gegenstand intensiver Forschung. Die erhöhten S1P-Konzentrationen, die an Entzündungsherden nachgewiesen worden sind, werden der Aktivierung der Sphk1 durch inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ sowie LPS und Thrombin zugesprochen^{40, 41}. Solche hohen lokalen Konzentrationen von S1P könnten die Entzündungsreaktion verstärken, indem sie die Abgabe von Prostaglandinen wie PGE_2 steigern, Adhäsionsmoleküle induzieren, und damit vermehrt neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen rekrutieren⁴²⁻⁴⁴. Zudem werden durch S1P auch T-Zellen an Orten der Entzündung zurückgehalten⁴⁵ und die Aktivierung von dendritischen Zellen in den Lymphgefäßen verstärkt⁴⁶. Gleichzeitig könnte aber S1P über einen negativen Feedback-Mechanismus die lokale Entzündungsreaktion limitieren, indem es die Gefäßpermeabilität vermindert, die endotheliale Barrierefunktion verstärkt und die Leukozyten-Adhäsion inhibiert. Daher könnte lokal produziertes S1P ein wichtiger Faktor nicht nur für Ausmaß und Dauer der Entzündung sein, sondern auch für deren Beschränkung auf ein bestimmtes Areal und die Auflösung. Ein gutes Modell, um diese Abfolge nachzuvollziehen, ist die experimentelle Entzündung im Lungenmodell. Dort kommt es nach Applikation von LPA oder PAR-1 zu einem initialen Anstieg der Gefäßpermeabilität. Gleichzeitig stimulieren beide Substanzen aber auch die Produktion von S1P durch die Sphk-1. Der dadurch kontinuierlich steigende S1P-Spiegel „versiegelt“ anschließend das Endothel und hemmt die Gefäßpermeabilität über eine Aktivierung des S1P₁-Rezeptors und limitiert so den Gewebsschaden^{41, 47}. Die gefäßabdichtenden Effekte von S1P bei Entzündung beschränken sich nicht nur auf die lokale Vaskulatur entzündeter Organe, sondern scheinen auch bei systemischen Entzündungen bedeutsam zu sein. So schützt die Gabe eines S1P₁ Agonisten Mäuse, die kein S1P im Blut aufweisen (die s.g. *S1P-less mice*), vor einem durch PAF induzierten

generalisiertem Gefäßleck und dem dadurch ausgelösten Tod ⁴⁸. Darüber hinaus konnte für S1P ein bislang unbekannter Wirkmechanismus bei systemischen entzündlichen Prozessen wie z.B. bakterieller Sepsis identifiziert werden, der Blutgerinnung mit Entzündung koppelt. Dabei spielt die Aktivierung von dendritischen Zellen in der Lymphe durch S1P eine für die Ausbreitung der Entzündung und die Koagulopathie entscheidende Rolle ⁴⁶.

1.2 S1P-Rezeptoren und Signaltransduktion

1.2.1 Allgemeines

Viele S1P-vermittelte Effekte können durch Pertussis Toxin blockiert werden. Pertussis Toxin ist ein G-Protein Inhibitor, der verhindert, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) das heterotrimere G-Protein G_i oder G_o aktivieren können. Aus diesen Daten ließ sich ableiten, dass die Rezeptoren für S1P zu der Familie der GPCRs gehören müssen ⁴⁹. GPCRs zeichnen sich durch sieben α -helikale Transmembrandomänen aus, wobei der Amino-Terminus extrazellulär, und der Carboxy-Terminus intrazellulär liegen. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ und binden Guanosindiphosphat (GDP) über eine Bindungsdomäne auf der α -Untereinheit. Diese Proteine können durch den Rezeptor, mit dem sie assoziiert sind, aktiviert werden, indem die α -Untereinheit das gebundene GDP gegen ein Guanosintriphosphat (GTP) austauscht. Durch die nachfolgende Dissoziation von α -Untereinheit und β - γ -Untereinheit können die Signale interzellulär weitergeleitet werden. Von der α -Untereinheit sind mehr als 20 Isoformen bekannt die aufgrund ihrer Eigenschaften in 4 Gruppen zusammengefasst werden. Die Nomenklatur der G-Proteine (G_s , G_i , G_q und $G_{12/13}$) orientiert sich an dem Namen der α -Untereinheit (α_s , α_i , α_q und $\alpha_{12/13}$). Der

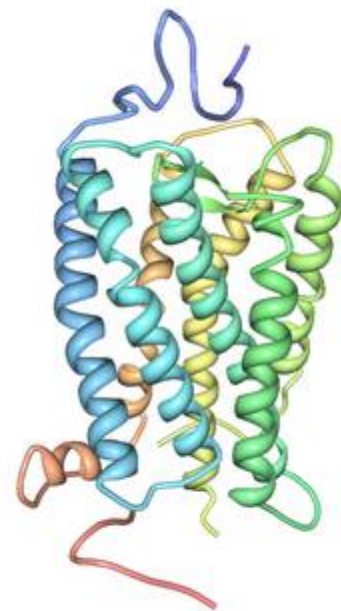


Abbildung 2: 3D Bändermodell des bovinen Rhodopsins

Protein Data Bank (PDB) 1L9H

PDB Protein Workshop 3.6

bestbekannte und beschriebene GPCR ist das Rhodopsin (Abb. 2). Durch Röntgenstrukturanalyse konnte die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins als typischen Vertreter der GPCR von Vertebraten dargestellt werden⁵⁰. Ende 2007 wurde dann die Kristallstruktur des humanen $\beta 2$ Adenorezeptors publiziert⁵¹. Es gibt fünf verwandte S1P-Rezeptoren, die verschiedene G-Proteine (G_i , G_q , $G_{12/13}$) binden, was zu einer Vielzahl von möglichen Signalkaskaden führt, da die verschiedenen G-Proteine verschiedene Stoffwechselwege vermitteln. Einige der klassischen G-Protein vermittelten Signalwege konnten nach Aktivierung von S1P-Rezeptoren in den verschiedensten Zelltypen nachgewiesen werden wie z.B.: 1) G_q -vermittelte Signalwege wie Phospholipase C (PLC) Aktivierung und Kalzium Mobilisierung; 2) G_i -vermittelte Signalwege wie ERK- und PI_3 Kinase-Aktivierung bzw. die Hemmung der Adenylatcyclase (AC), und 3) $G_{12/13}$ -vermittelte Signalwege wie Rho-Aktivierung und Aktin-Rearrangements⁵² (Abb. 3).

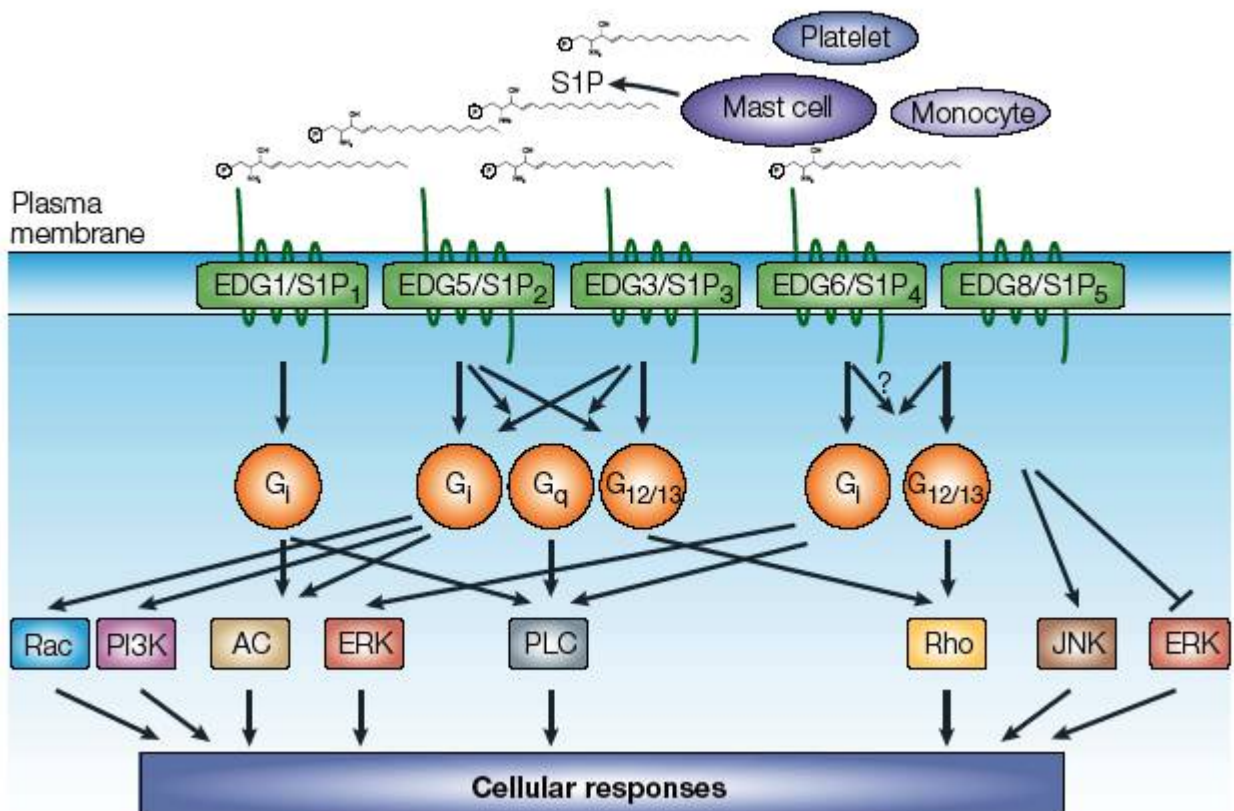


Abbildung 3: Mögliche Signalwege der 5 G-Protein gekoppelten S1P Rezeptoren

Aus: Spiegel, S. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 May;4(5):397-407

Das Transkript für den S1P₁-Rezeptor wurde erstmals während der Differenzierung von Endothelzellen isoliert und daher initial *Endothelial-differentiation-gene-1* (EDG1) genannt⁵³. Im Verlauf wurden noch 7 weitere „Edg“ Gene gefunden, die in numerischer Reihenfolge benannt wurden. Als 1998 zwei Gruppen unabhängig voneinander herausfanden, dass einige Edg als Rezeptoren für S1P und andere Lysophospholipide dienten^{54, 55}, resultierte daraus eine verwirrende Nomenklatur: bei den Rezeptoren für S1P sprach man von Edg1, Edg3, Edg5, Edg6 und Edg8, während die restlichen Rezeptoren, die das verwandte Molekül Lysophosphatidylsäure (LPA) banden, Edg2, Edg4, Edg7 genannt wurden. Daraufhin nahm die „International Union of Pharmacology“ 2002 eine Umbenennung der verschiedenen Edg vor und trennte sie in S1P-Rezeptoren und LPA-Rezeptoren, was bis heute als anerkannte Nomenklatur dient⁵⁶.

1.2.2 S1P₁ (Edg1)

Der S1P₁-Rezeptor ist ein in Geweben von Menschen und Nagern weit verbreiteter Rezeptor. Hohe Expression zeigen Milz, Hirn, Herz, Lunge, adipöses Gewebe und die Leber einer adulten Maus während in Thymus, Niere, Muskel und Uterus deutlich weniger und in Magen, Hoden, Darm und der Haut fast keine Expression zu finden ist⁵⁷⁻⁵⁹. Ein systemischer Knockout dieses Rezeptors führt zu einer fehlerhaften Reifung der Gefäße während der Embryonalentwicklung. Die Gefäßwand kann sich nicht korrekt ausbilden, da Perizyten und glatte Muskelzellen nicht in der Lage sind, das Gefäß zu umschließen und zu stabilisieren, was durch Gefäßrupturen und den damit einhergehenden Blutungen zu intrauteriner Letalität zwischen E12,5 und E14,5 führt⁷. Dieses Phänomen wird aber nicht über den S1P₁ auf glatten Muskelzellen vermittelt, sondern über den S1P₁ auf Endothelzellen, da der Endothelzell-spezifische S1P₁ Knockout zum gleichen letalen Phänotyp führt⁶⁰. Dass der S1P₁ auf Endothelzellen auch wichtig bei der postnatalen Angiogenese ist, konnte darüber hinaus in einem Tumormodell gezeigt werden: dort führte das Ausschalten des S1P₁-Rezeptors durch siRNA zu einem verminderten Tumorwachstum *in vivo* und einer Inhibition der endothelialen Migration *in vitro*⁶¹.

1.2.3 S1P₂(Edg5)

Wie der S1P₁ zeigt auch der S1P₂ in Menschen und Nagern eine ubiquitäre Expression. Der Verlust dieses Rezeptors durch einen systemischen Knockout zeigt allerdings, dass der S1P₂ völlig andere Effekte vermittelt als der S1P₁. Während der Verlust des S1P₁ die normale Gefäßentwicklung beeinträchtigt, zeigen sich S1P₂ Knockout Mäuse resistent gegenüber der pathologischen durch Hypoxie-ausgelösten Angiogenese⁶². Dies impliziert, dass S1P₂ kausal an der ischämischen Retinopathie beteiligt ist⁶². S1P₂ Knockout Mäuse haben aber auch einen anderen auffälligen Phänotyp. Sie verlieren 14 Tage nach der Geburt das Gehör und entwickeln einen Defekt der *Stria vascularis*, der sich in einer von der Basis zum Apex verlaufenden Degeneration der Haarzellen im Cortischen Organ der Cochlea und einem Verlust der Neuronen des Spiralganglions manifestiert⁶³.

1.2.4 S1P₃(Edg3)

Wie S1P₁ und S1P₂ ist auch der S1P₃-Rezeptor in fast allen Geweben exprimiert, allerdings am meisten in glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Der S1P₃-Rezeptor koppelt an mehreren G-Proteinen – G_i, G_q und G_{12/13}. Viele Effekte von S1P die das Gefäß direkt betreffen, werden über den S1P₃-Rezeptor vermittelt. So können sowohl S1P als auch das S1P-Analog FTY720 eine Stickstoffmonoxid-abhängige Vasodilatation induzieren^{26, 64}, und die Migration und das Überleben von Endothelzellen über den S1P₃-Rezeptor vermitteln⁶⁵. Außerdem kann S1P die Kalzium-Ausschüttung aus intrazellulären Depots über den S1P₃-Rezeptor stimulieren⁶⁶. Eine wichtige Rolle spielt der Rezeptor auch im Herzen. So schützt z.B. die Gabe von S1P das Herz vor dem Reperfusionsschaden nach Ischämie über den endothelialen S1P₃⁶⁷. Darüber hinaus fördert die Stimulation des S1P₃ auf endothelialen Progenitor-Zellen die Wiederherstellung des Blutflusses im Hinterlauf-Ischämie-Modell⁶⁸. Obwohl S1P₃ viele verschiedene Effekte unter pathophysiologischen Bedingungen hat, ist der Phänotyp des systemischen Knockouts dieses Rezeptors, von einer leicht verminderten Fertilität abgesehen, unter normalen Bedingungen weitgehend unauffällig.

1.2.5 S1P₄(Edg6)

Im Gegensatz zu der weit verbreiteten Expression von S1P₁₋₃ wurde der S1P₄-Rezeptor lediglich in der Lunge und in lymphoiden und hämatopoetischen Geweben wie Thymus und Milz von Nagern und Menschen gefunden. Er wurde aus *in vitro* differenzierten humanen und murinen dendritischen Zellen isoliert und als hoch-affiner Rezeptor für S1P identifiziert⁶⁹. Über dessen Funktionen ist noch nicht viel bekannt, außer der Beobachtung einer erhöhten S1P-unabhängigen Motilität von S1P₄-tragenden Zellen sowie der ausgeprägten Akkumulation von peripheren Stress-Fasern und Zellabrundung nach Zugabe von S1P⁷⁰. Die Rolle von S1P₄ bei der T-Zell Migration wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Wang *et al.* erklärten, dass S1P₄ keine Einfluss darauf hat, während Matsuyuki *et al.* das genaue Gegenteil behaupten^{71, 72}.

1.2.6 S1P₅(Edg8)

Ähnlich wie S1P₄ zeigt auch der S1P₅-Rezeptor nur ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster. Er wurde im adulten humanen und murinen Gehirn, Milz und Haut von Nagern gefunden. Der S1P₅-Rezeptor wurde erstmals aus Pheochromocytoma 12 (PC12) Zellen der Ratte kloniert und als „*Nerve growth factor-regulated gene-1*“ (NRG-1) bezeichnet⁷³. Kurze Zeit später konnte ihn eine andere Gruppe aus dem Gehirn der Ratte isolieren, wo er stark in der weißen Masse enthalten ist, und wies S1P als dessen Liganden nach⁷⁴. Über die genauen Funktionen des Rezeptors ist bis heute nicht viel bekannt. Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass eine Stimulation dieses Rezeptors die Migration von Oligodendrozyten-Progenitorzellen hemmt⁷⁵ und deren Überleben fördert⁷⁶.

1.3 S1P und dessen Rezeptoren im Kontext der Atherosklerose

1.3.1 Atherosklerose

Erkrankungen des Herz-Kreislauf Systems gehören zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Eine Untersuchung des statistischen Bundesamtes konnte 2004 zeigen, dass Angina pectoris auf Platz 3, Myokardinfarkt auf Platz 6 und Atherosklerose auf Platz 13 der 20 häufigsten

Diagnosen bei Männern zu finden ist. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind bei Frauen deutlich seltener, doch auch hier belegen Angina pectoris Platz 5 und Schlaganfall Platz 11. Allein im Jahr 2005 wurden bei über 350.000 Patienten "Krankheiten des Kreislaufsystems" als Todesursache angegeben. Risikofaktoren für die Atherosklerose sind Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus, Infektionen, freie Radikale und Hyperhomocysteinämie ⁷⁷. Doch auch das Alter oder das männliche Geschlecht zählen zu den Risikofaktoren, da Männer bis zu fünfmal häufiger an arteriellen Verschlusskrankheiten erkranken als Frauen. Allerdings steigt auch bei Frauen das Atherosklerose-Risiko nach den Wechseljahren deutlich an. Viel spricht somit dafür, dass Sexualhormone – Testosteron und Östrogen – bei der Atherosklerose-Entstehung eine Rolle spielen. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist die genetische Veranlagung, da Erkrankungen wie *Diabetes mellitus* oder Störungen des Fettstoffwechsels – beides Risikofaktoren für die Atherosklerose – oft eine familiäre Häufung aufweisen.

Atherosklerose ist eine entzündliche fibroproliferative Erkrankung der Gefäße, die häufig zu koronarer Herzkrankheit (KHK), Herzinfarkt, peripherer Verschlusskrankheit (pAVK) und Schlaganfall führt. Der langsame Verlauf der Krankheit geht einher mit der Akkumulation von Zellen, Lipiden und fibrösem Material in der Intima des Gefäßes, Dyslipidämie und der Dysfunktion des Endothels ^{78, 79}. Atherosklerotische Läsionen bilden sich vorzugsweise an Biegungen oder Verzweigungen der Gefäße. Der dort vorherrschende turbulente Blutfluss ruft hämodynamische Scherkräfte hervor, die eine erhöhte Permeabilität des Endothels verursachen, was wiederum zur verstärkten Diffusion von Makromolekülen wie LDL in die Gefäßwand führt ^{80, 81}. Das LDL akkumuliert an diesen Stellen und wird über mehrere Schritte modifiziert und oxidiert. Das oxidierte LDL aktiviert die darüber liegenden Endothelzellen und stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 ⁸². Diese sind an der Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten aus dem Blut zur atherosklerotischen Läsion beteiligt. Diese Zellen wandern in die beginnende Läsion ein und sorgen für eine Ausbreitung des inflammatorischen und fibroproliferativen Prozesses. Die Monozyten differenzieren in der Läsion zu Makrophagen, welche die dort vorhandenen Lipide, vor allem das oxidierte LDL, durch Phagozytose aufnehmen und zu Lipid-geladenen Schaumzellen werden ⁸³. Die aktivierten Endothelzellen schütten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aus, die dafür sorgen, dass glatte Muskelzellen aus der

benachbarten Media in die beginnende Läsion einwandern. Diese Läsionen sind trotz der Vielzahl der dort stattfinden Prozessen noch klinisch unauffällig und entwickeln sich erst im Laufe der Zeit zu komplexen Plaques. Die Gefährlichkeit dieser komplexen Plaques besteht in einem erhöhten Risiko der Ruptur und dem damit einhergehendem Gefäßverschluss durch Ausbildung eines Thrombus. Solche Rupturen finden vor allem bei Plaques statt, die bereits eine fibröse Kappe über dem Lipidkern haben, den so genannten Fibroatheromen⁸⁴. Wenn dort das Endothel zum Beispiel durch Apoptose geschädigt wird (Plaque-Erosion), oder die Kappe durch hämodynamische Scherkräfte aufreißt (Plaque-Ruptur), kommt das Blut mit dem thrombogenen und prokoagulantem Material der Plaque in Kontakt, und es kommt zur Thrombus-Bildung (Abb. 4). Verschließt der Thrombus das Koronargefäß, führt dies zum akuten Myokardinfarkt⁸⁵.

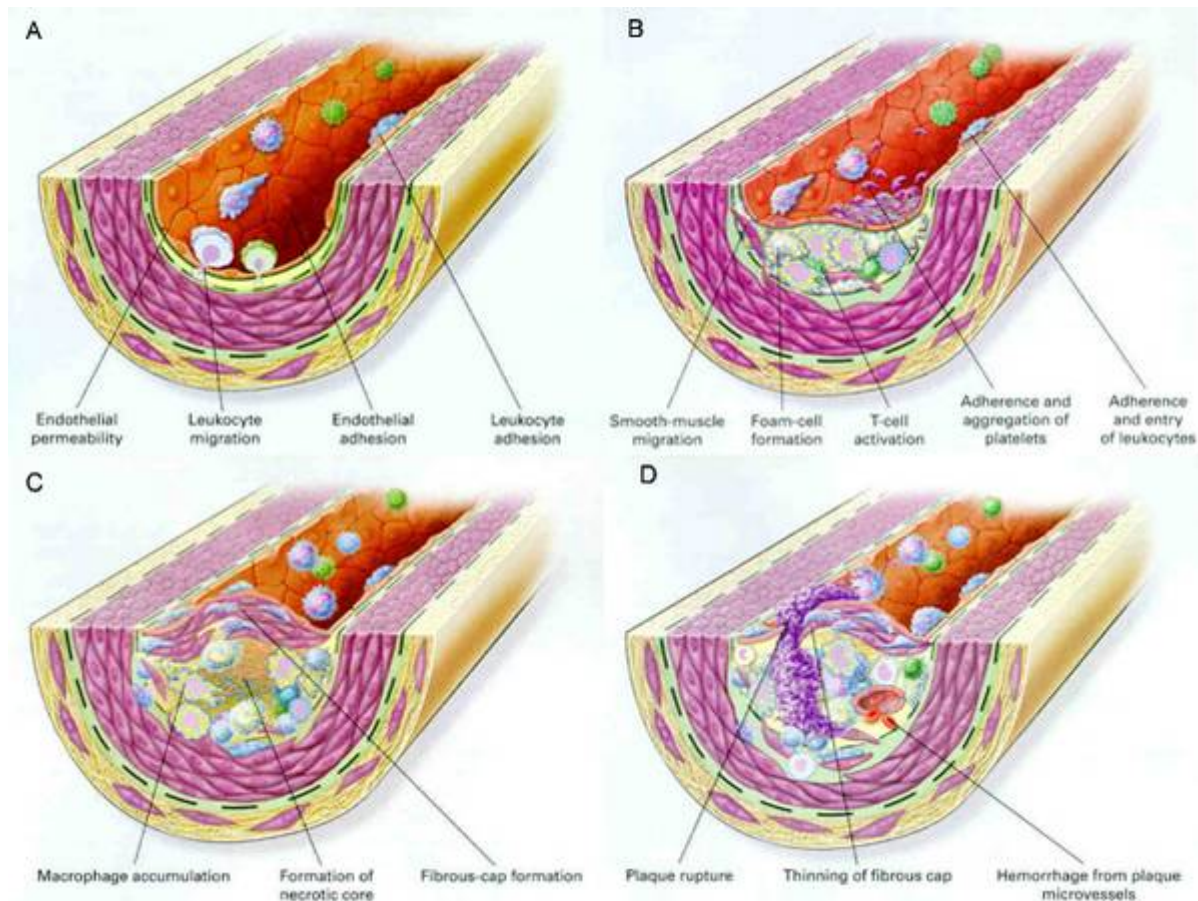


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Progression der Atherosklerose

A: Beginn der Läsionsbildung durch Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten aus dem Blut („fatty streak“). B: klinisch unauffällige Läsion, die durch Schaumzellbildung, und die Einwanderung von glatten Muskelzellen charakterisiert wird. C: komplexe Läsion mit einem nekrotischen Kern, Makrophagen Akkumulation und der Bildung einer fibrösen Kappe. D: Rupturierter Plaque mit Thrombus Bildung. Verändert nach Ross R. Am Heart J. 1999

Atherosklerotische Veränderungen des Gefäßes können nach Stary in 8 verschiedene Typen von Läsionen eingeteilt werden⁸⁶. Die Typen I und II werden als frühe Läsionen bezeichnet, die Typen III bis V als intermediäre und die Typen VI bis VIII als fortgeschrittene Läsionen.

Frühe atherosklerotische Läsionen findet man bereits bei jungen Erwachsenen. Sie sind gekennzeichnet durch den „fatty streak“ in der Arterienwand und bestehen hauptsächlich aus Monozyten und T-Zellen. Die intermediäre Läsion nach Stary III-V stellt ein Fortschreiten der Entzündung in der Gefäßwand mit Bildung von extrazellulären Cholesterinkristallen, die im histologischen Schnitt eindeutig zu erkennen sind, dar⁸⁷. Durch die weiterhin stattfindende Einwanderung von Monozyten und

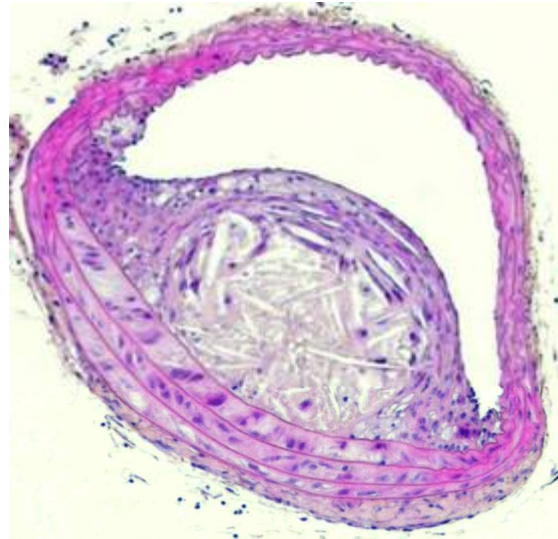


Abbildung 5: Beispiel einer komplexen Läsion

H&E Färbung einer Läsion in der BCA einer ApoE^{-/-} Maus mit großem nekrotischen Kern und Cholesterin-Kristallen.

T-Zellen kommt es zu einer Verdickung der Gefäßwand und damit zu einer Dilatation des Gefäßes durch Remodelling. Durch diesen kompensatorischen Mechanismus soll das Lumen trotz sich weiter verdickender Gefäßwände für den Blutfluss offen gehalten werden. Fortgeschrittene Läsionen zeichnen sich laut der Klassifikation nach Stary V-VIII durch eine Verstärkung der Inflammation durch hydrolytische Enzyme und pro-inflammatorische Mediatoren mit einer damit einhergehenden Nekrose der Schaumzellen im Zentrum der Plaque aus. Es kommt zur Ausbildung einer komplexen Läsion (Abb. 5), die sich durch eine fibröse Kappe über einem nekrotischen Kern mit Cholesterin-Pools auszeichnet⁸⁷. Die Zusammensetzung und damit die Dicke und Stabilität der fibrösen Kappe wird durch den Anteil an glatten Muskelzellen und Kollagen bestimmt. Eine stabile Plaque zeichnet sich durch eine dicke fibröse Kappe über einem kleinen Lipidkern aus, die aus vielen glatten Muskelzellen und Kollagen besteht. Instabile Plaques bestehen im Gegensatz dazu aus einer dünnen fibrösen Kappe mit sehr viel weniger glatten Muskelzellen und

Kollagen, einem großen Lipidkern und vielen inflammatorischen Zellen⁸⁸. Ausdünnungen der fibrösen Kappe finden sich häufig an den peripheren Regionen der Plaque – den so genannten Schultern – wo meistens auch Akkumulationen von Makrophagen und T-Zellen zu finden sind. Diese beiden Zelltypen können proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Cathepsine sezernieren, die die extrazelluläre Matrix der fibrösen Kappe verdauen, diese damit mechanisch schwächen und für eine Ruptur anfällig machen⁸⁹. Zusätzlich zu den MMPs findet man an den Plaqueschultern auch die stärksten Gefäßwandspannungen, die z.B. bei einer hypertensiven Krise weiter verstärkt werden und eine Ruptur der Plaque begünstigen können⁹⁰. Zu den schwerwiegendsten klinischen Folgen einer rupturierten Plaque zählen Herzinfarkt und Schlaganfall.

Zahlreiche epidemiologische und klinische Interventionsstudien haben gezeigt, dass hohe Werte von HDL-Cholesterin (HDL-C) im Plasma vor KHK, Herzinfarkt, Schlaganfall und Atherosklerose schützen können. Damit ist der Plasma-Spiegel an HDL-C der stärkste negative Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse⁹¹. Der positive Effekt von HDL auf den Verlauf der Atherosklerose wurde zum Großteil dem reversen Cholesterintransport zugeschrieben, an dem HDL entscheidend beteiligt ist, und der für den Transport von überschüssigem Cholesterin aus den lipidreichen atherosklerotischen Gefäßen zurück zur Leber verantwortlich ist. Das führt dann im Folgenden zu einer Reduktion der Lipid-Last in der Läsion⁹². Die Effekte von HDL gehen jedoch weit über den reversen Cholesterintransport hinaus. Potente antioxidative, anti-inflammatorische und gefäßerweiternde Eigenschaften werden HDL ebenfalls zugeschrieben, die auch zu dessen atheroprotektiver Wirkung beitragen könnten^{93, 94}. Trotz all dieser Erkenntnisse ist nur wenig darüber bekannt welche Bestandteile des HDL Partikels genau die Fülle an biologischen Effekten vermitteln^{93, 94}. Das HDL-Partikel hat eine äußerst komplexe biophysikalische Struktur, die viele verschiedene Proteine und Lipide beinhaltet^{95, 96}. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich unter den diversen Lipiden auch Phospholipide und – im Hinblick auf die hier vorgestellte Arbeit bedeutsam – Sphingolipide sowie insbesondere S1P befinden^{21, 26, 97}. Wie schon erwähnt kommt S1P im Plasma in physiologisch relevanten Mengen vor^{20, 97} und ist zum Großteil im HDL gebunden²¹. Die von HDL verursachten Effekte könnten also durchaus zum Teil durch dessen S1P-Bestandteil vermittelt werden. Hinweise darauf lieferten Studien, die zeigten,

dass HDL den Gefäßtonus reguliert, indem es die endotheliale NO Synthase (eNOS) über S1P-Rezeptoren aktiviert und dadurch etwa 50% der HDL-induzierten Vasodilatation über den S1P₃-Rezeptor vermittelt²⁶. Weiterhin konnte durch Studien mit pharmakologischen S1P₁-Rezeptor Antagonisten gezeigt werden, dass HDL die Motilität von Endothelzellen sowie die Integrität des Endothels zum Teil durch seine Wirkung auf den S1P₁ verbessert⁹⁸. Für S1P als funktionellem Mediator dieser Effekte spricht auch die Tatsache, dass S1P selbst nachweislich die Migration und Proliferation von Endothelzellen fördert^{9, 99} und die Barrierefunktion des Endothels verbessert^{31, 47}. HDL fungiert also als Carrier, der das S1P gezielt Zellen präsentiert, um so biologische Effekte auszulösen. Wie genau diese Präsentation abläuft, ist allerdings bis heute unklar.

1.3.2 S1P Wirkungen in der Gefäßwand

1.3.2.1 S1P Wirkungen auf das Endothel

Die S1P-Rezeptoren, die am häufigsten auf der endothelialen Zelloberfläche exprimiert werden, sind S1P₁, S1P₂ und S1P₃, wobei S1P₁ am stärksten, und S1P₂ und S1P₃ in etwa gleichstark vertreten sind¹⁰⁰. Obwohl es noch nicht systematisch untersucht wurde, weisen Endothelzellen verschiedener Abstammung (Arterien, Kapillaren, Venen und Lymphgefäße) verschiedene Expressionslevel dieser Rezeptoren auf. Ein ähnliches Phänomen zeigt sich bei Endothelzellen aus verschiedenen Arterien (*Aorta*, *Aa. femorales*, *mesentericae*, *basilares*, *carotis*, *coronariae*), wo ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster vorzukommen scheinen. Viele Faktoren wie zum Beispiel lokaler Blutfluss, Zytokine und S1P-Plasma-Spiegel könnten zu diesen unterschiedlichen Expressionsmustern der S1P-Rezeptoren führen. Deren Aktivierung durch S1P führt in Endothelzellen unter anderem zu Zellmigration und Proliferation^{101, 102}, Angiogenese, zellulärer Morphogenese, Ausbildung Kapillar-ähnlicher Netzwerke und Expression von Adhäsionsmolekülen⁸. Die Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion beginnt mit einer Aktivierung des Endothels und einer dadurch erfolgenden Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, der deren Diapedese in den subendothelialen Spalt folgt. S1P hat einen „abdichtenden“ Effekt auf das Endothel, was mit einer verminderten Permeabilität des Gefäßes einhergeht und die Diapedese von Entzündungszellen

verringert. *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass S1P diese Barrierefunktion abhängig von G_i stimuliert ¹⁰³.

Die durch verringerte NO-Bioverfügbarkeit bedingte endotheliale Dysfunktion (ED) ist ein Schlüsselmechanismus in der Pathogenese der Atherosklerose, der zu Apoptose von Endothelzellen, Plaque-Erosion und intravaskulärer Thrombose führen kann. Ein wichtiger Schutzfaktor vor Apoptose ist NO. S1P kann die NO Produktion aktivieren, was es zu einem wichtigen anti-apoptotischen Faktor für Endothelzellen macht. Durch antisense Oligonukleotide konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über $S1P_1$ und zum Teil über $S1P_3$ vermittelt wird ¹⁰⁴. Auch eine Überexpression von Sphk1 führt durch erhöhte S1P-Produktion, Aktivierung des PI_3K / Akt Signalweges und Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins *B-Cell Lymphoma gene-2* (BCL-2) zu einem besseren Überleben von Endothelzellen ¹⁰⁵. Somit hat S1P verschiedene Wirkungen auf das Endothel, die alle für die Pathogenese der Atherosklerose relevant sein könnten.

1.3.2.2 S1P Wirkungen auf vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC)

Die S1P-Rezeptoren werden unterschiedlich stark auf VSMC exprimiert, und zwar, wie bei Endothelzellen, abhängig vom Gefäßbett. VSMC aus der Media von adulten Mäusen exprimieren beispielsweise $S1P_2$ und $S1P_3$, während VSMC aus der Intima von Jungtieren die Subtypen $S1P_1$, $S1P_2$ und $S1P_3$ gleichermaßen auf der Oberfläche tragen. Die Zellen der Intima reagieren auf den Stimulus S1P mit Proliferation und Migration, während Zellen aus der Media dies scheinbar nicht vermögen ¹⁰⁶. Das liefert möglicherweise Hinweise darauf, dass S1P bei Gefäßerkrankungen, welche die Intima betreffen (wie Restenose nach Angioplastie oder Atherosklerose) eine Rolle spielen könnte. Sowohl Migration als auch Proliferation von VSMC werden mittels des G_i -gekoppelten $p70S6$ -Signalwegs über den $S1P_1$ -Rezeptor induziert ¹⁰⁶. Im Gegensatz dazu inhibiert $S1P_2$ die kleine GTPase Rac und damit die Zellmigration. Solche gegenteilige Effekte von $S1P_1$ und $S1P_2$ könnten eine wichtige Rolle bei der Regulation von Gefäßfunktion und arteriellem Remodelling spielen. In humanen atherosklerotischen Läsionen konnte eine Überexpression von $S1P_1$ gezeigt werden ¹⁰⁷, was die potentiell bedeutende Rolle dieses Rezeptors im Kontext von Gefäßerkrankungen im allgemeinen und Atherosklerose im besonderen unterstreicht. In bestimmten Gefäßen wie der *Arteria*

basilaris im Hirn¹⁰⁸, den Herzkranzgefäßen, Mesenterialgefäßen und Nierenarterien^{109, 110} wirkt S1P als Vasokonstriktor, was den Blutfluss zu den Organen reduziert. Andererseits kann S1P über die Stimulation der endothelialen NO-Produktion eine Vasodilatation in vorkontrahierten Gefäßen auslösen und kann damit, offenbar in Abhängigkeit vom vorliegenden arteriellen Tonus, auch zur Verbesserung des Blutflusses führen. Diese nur im funktionellen Kontext zu verstehenden Funktionen von S1P zeigen auch, dass es in gesunden Gefäßen (mit intaktem Endothel) höchst unterschiedliche Effekte im Vergleich zu pathologisch veränderten Gefäßen (mit geschädigtem oder entzündetem Endothel) zur Folge haben kann.

1.3.2.3 S1P Wirkungen auf Makrophagen

Makrophagen tragen die Rezeptor-Subtypen S1P₁₋₃ auf ihrer Oberfläche und reagieren bei gleichzeitiger Stimulation mit S1P, LPS und IFN- γ mit der Expression eines anti-inflammatorischen Zytokinprofils im Vergleich zu LPS und IFN- γ allein¹¹¹. Apoptotische Tumor-Zellen geben S1P ins Medium ab, das dann sowohl als Überlebens-Signal als auch als „*come-and-get-me*“ Signal für Makrophagen dient^{112, 113}. Im selben Kontext bewirkt S1P eine Umwandlung der Tumor-assoziierten Makrophagen zum so genannten M2-Typ, der durch eine verringerte Produktion von TNF- α und IL12-p70 sowie erhöhte Sekretion von IL-8 und IL-10 charakterisiert wird¹¹². Nur eine Studie hat sich bislang mit dem *in vivo* Homing von Makrophagen in Verbindung mit S1P beschäftigt¹¹⁴. Dort konnte gezeigt werden, dass S1P-Agonisten zu einem verstärkten Homing von Makrophagen in murinen Lymphknoten führen, indem sie die endothelialen Kontakte mit Lymphozyten und die Komplexformation an endothelialen Zell-Zell Kontakten fördern¹¹⁴. Die Wirkung von S1P auf Makrophagen im Kontext der Atherosklerose jedoch ist bis heute gänzlich unbekannt.

1.4 S1P in der Atherosklerose. Pro- oder anti-atherosklerotisch?

Die Rolle von S1P und dessen Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose ist bis heute kaum erforscht und ein viel debattiertes Thema. Vor allem wird die Frage, ob S1P die Atherosklerose fördert oder hemmt in der Literatur kontrovers diskutiert^{100, 115}. Auf der einen Seite fördert S1P das Überleben von Zellen, die

Integrität der Gefäße und NO-Produktion in Endothelzellen, was allesamt potentiell atheroprotektive Effekte darstellen. Auf der anderen Seite induziert S1P in glatten Muskelzellen die Proliferation und Migration und erhöht den Vasotonus. Dies sind Prozesse, die eine Läsionsbildung fördern könnten und somit potentiell pro-atherogen wären. Diese Effekte laufen *in vivo* nebeneinander ab und verdeutlichen die Komplexität der Wirkung von S1P auf das Gefäßsystem. Auch über die Effekte von S1P auf T-Lymphozyten und Makrophagen in der Läsion ist bislang nichts bekannt. Darüber hinaus sind S1P-produzierende Enzyme wie die Sphingosinkinase 1 (Sphk1) und S1P-Rezeptoren wie der S1P₁ in atherosklerotischen Läsionen ¹⁰⁷ hochreguliert. Auch die Plasma-Spiegel von S1P scheinen mit dem Schweregrad der Stenose bei koronarer Herzkrankheit zu korrelieren ¹¹⁶. Daher sind dringend Studien erforderlich, die eine Aussage über eine mutmaßlich kausale Rolle von S1P und dessen Rezeptoren in der Atherosklerose ermöglichen.

1.5 S1P-Agonisten als Medikamente in der Transplantationsmedizin und bei Multipler Sklerose

Es gibt eine Vielzahl verschiedener synthetischer Liganden für die S1P-Rezeptoren, die sowohl agonistisch als auch antagonistisch auf einen oder mehrere S1P-Rezeptoren wirken können. Sie haben eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit S1P, wobei nur kleine Änderungen, zum Beispiel in der Substitution am Ring, eine andere Wirkung dieser Liganden an den Rezeptoren zur Folge haben (Abb. 6). Ein solcher Ligand ist zum Beispiel VPC23019. Dies ist ein Antagonist für S1P₁ und S1P₃, wirkt jedoch als Agonist auf S1P₄ ¹¹⁷. Darüber hinaus gibt es noch viele verschiedene andere Liganden auf der Basis von VPC 23019. So zeigen VPC23153 und VPC24191 agonistische Effekte auf S1P₁, S1P₃, S1P₄ und S1P₅ ¹¹⁸, während VPC44116 ein selektiver Antagonist für den S1P₁-Rezeptor ist.

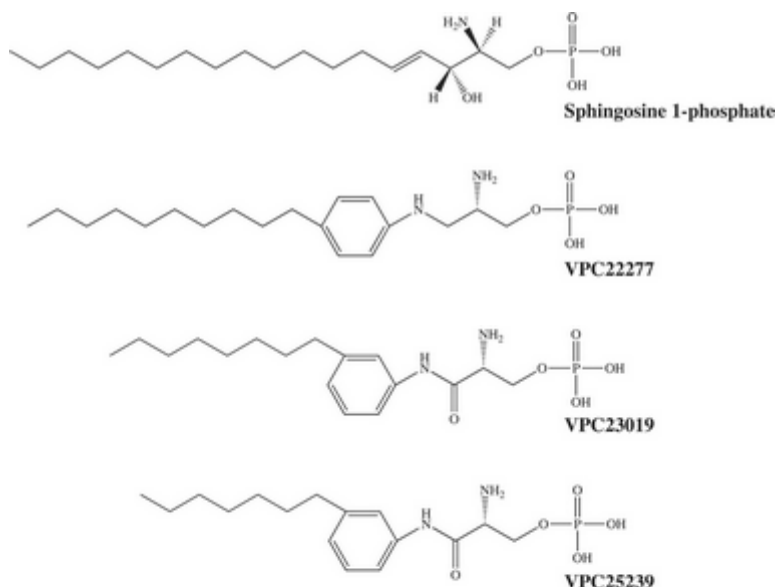


Abbildung 6: Strukturformeln von S1P und auf S1P basierender Analoga der VPC Familie

Ein weiterer Agonist für S1P₁, S1P₃, S1P₄ und S1P₅ ist FTY720-P¹⁰. FTY720 ist eine synthetische Nachbildung von Myriocin, einem Stoffwechselprodukt des Pilzes *Isaria sinclairii* und besitzt im phosphorylierten Zustand große strukturelle Ähnlichkeit mit S1P (Abb. 7). Es besitzt einen lipophilen Schwanz, eine 2-Amino Gruppe und eine Phosphat-Kopfgruppe. Durch endogene Phosphorylierung durch die Sphingosin-Kinase 2 wird das biologisch aktive FTY720-P gebildet, was als Agonist auf 4 der 5 S1P-Rezeptoren wirkt. Die fehlende Wirkung auf den S1P₂-Rezeptor lässt sich durch den Phenyl-Ring erklären, der sich zwischen dem polaren Kopf und dem lipophilen Schwanz des Moleküls befindet¹¹⁸.

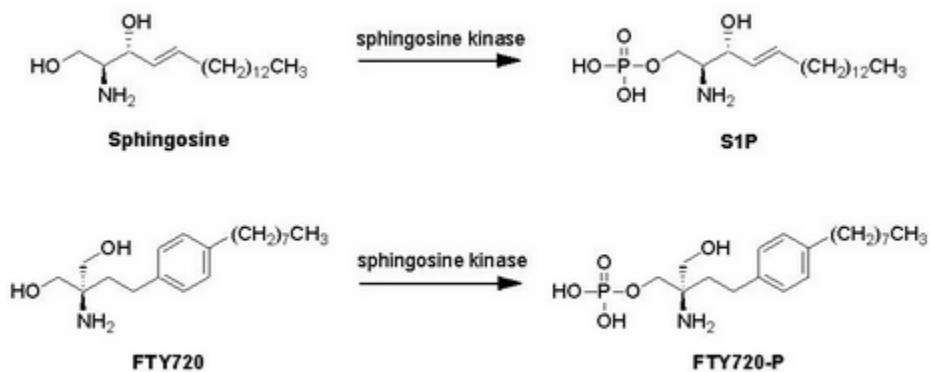


Abbildung 7: Strukturelle Analogie zwischen S1P und FTY720-P

FTY720 ist ein potentes Immunsuppressivum, dessen Wirkung auf einer Internalisierung mit anschließender proteosomaler Degradation des S1P₁-Rezeptors beruht. Dies führt dazu, dass die Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen festgehalten werden, was sich als periphere Lymphopenie manifestiert ¹¹⁹. FTY720 wird momentan in Phase III klinischer Studien für die Behandlung von Multipler Sklerose eingesetzt. Multiple Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung, bei der Oligodendrozyten, die die Myelinscheide um die Axone im Zentralnervensystem bilden, durch T-Zellen und Makrophagen zerstört werden ¹²⁰. Daraus resultiert eine fortschreitende Demyelinierung und damit einhergehende neuronale Ausfälle bei Patienten. Für FTY720 konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass die einmal tägliche orale Gabe zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsbildes führte ¹²¹. Diese Verbesserung wurde anhand von verminderten Rückfällen und morphologisch an einer Abnahme der demyelinisierten Läsionen im ZNS mittels Magnet-Resonanz Tomographie (MRT) festgestellt. Einen weiteren Beweis für die Wirksamkeit zeigte die Placebo Gruppe, bei denen erst nach Umstellung auf FTY720 eine Verbesserung des Krankheitsbildes beobachtet werden konnte ¹²¹.

Neben seinen Eigenschaften als Modulator des Immunsystems zeigt FTY720 auch direkte Effekte auf Gefäßzellen und auf das Gefäß selbst. So zeigten aus Patienten gewonnene Endotheliale Progenitor Zellen die mit FTY720 behandelt wurden eine verbesserte Wiederherstellung des Blutflusses in einem Hinterlauf Ischämie Modell in der Maus ⁶⁸. Darüber hinaus blockiert FTY720 die VEGF induzierte Gefäßdurchlässigkeit *in vivo* ¹²². Die Wirkungen von FTY720 auf Endothelzellen sind wichtige Voraussetzungen für die Regulation der Gefäßdurchlässigkeit und eine potentielle Inhibition der Inflammation, was als Schutz vor Atherosklerose wichtig ist. In einem Langzeit-Herztransplantations-Modell in der Maus fördert FTY720 das Überleben und scheint an einer Verringerung der Transplantat-Atherosklerose beteiligt zu sein ¹²³. Unbekannt war bis zum Beginn dieser Arbeit, ob, und wenn ja welche, Wirkung S1P-Agonisten wie FTY720 auf die Pathogenese der nativen Atherosklerose haben.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein biologisch aktives Sphingolipid, welches grundlegende physiologische Prozesse wie Entzündung, Immunität und kardiovaskuläre Funktionen reguliert. S1P vermittelt seine Signalwirkung über fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1P₁₋₅), die differentiell auf kardiovaskulären und hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Da die Rolle von S1P und seinen Rezeptoren in der Atherosklerose bis heute unbekannt ist, wird in dieser Arbeit versucht, den Beitrag einer pharmakologischen, auf S1P-basierten, Therapie und den Beitrag des S1P₃-Rezeptors an der Pathogenese dieser Erkrankung zu klären. Dieses Ziel wird durch den Einsatz des synthetischen S1P-Analogs FTY720 im Atherosklerose-Modell der Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) Maus sowie durch die Untersuchung von S1P₃^{-/-}/ApoE^{-/-} Doppel-Knockout-Mäusen verfolgt. Die Ergebnisse sollen erste *in vivo* Erkenntnisse über das Potential S1P-basierter Therapien für die kardiovaskuläre Medizin liefern, und helfen, die Bedeutung von S1P für die Diagnose und Therapie der Atherosklerose zu klären.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalie / Reagenz</u>	<u>Firma</u>
Acrylamid 4K Solution (30%) Mix 37,5:1	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Biozym (Oldendorf)
β-Mercaptoethanol	Sigma (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
BSA (Rinderserum Albumin Fraction V)	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck (Darmstadt)
Diaminobenzidin	Dako (Glostrup, Dänemark)
DMSO	Sigma (München)
EDTA	Sigma (München)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Eosin wasserlöslich, bläulich	neoLab (Heidelberg)
Ethanol (99%)	Sigma (München)
Ethanol (70%) vergällt	Apotheke Uniklinikum Essen
Ethidium Bromid	Sigma (München)
Formaldehydlösung Roti Histofix 4,5%	Roth (Karlsruhe)
FTY720	Novartis (Basel, Schweiz)
Gelatine (bovine)	Sigma (München)
Gene Ruler 100 bp Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
H ₂ O ₂ (30%)	AppliChem (Darmstadt)
Heparin Natrium Salz	Sigma (München)
Isofluran	Delta Select (München)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Mayers Hämalaun Lösung	Chroma (Münster)
Methanol	Sigma (München)
Na-Azid	Sigma (München)
Pharmlyse	Becton Dickinson (Heidelberg)
Phosphate-buffered Saline (PBS)	AppliChem (Darmstadt)

Pikrinsäure	Fluka (München)
Polycarbonat Membranen (Boyden Kammer)	Neuro Probe Inc. (Gaithersburg, USA)
Prestained Protein Marker, Broad Range S1P	New England Biolabs (Frankfurt Main)
Siriusrot F3BA	Biomol (Hamburg)
Streptavidin-POX 1mg/ml	Chroma (Münster)
Temed	Dianova (Hamburg)
Thioglykollat	Roth (Karlsruhe)
Vitroclud Eindeckelmedium	Sigma (München)
	Langenbrinck (Emmendingen)

Alle weiteren nicht explizit genannten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen.

2.1.2 Zellkulturprodukte

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Bovine Pituary Extract (BPE)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ceftazidim	Glaxo Smith Kline (München)
Collagenase 3	Worthington (Lakewood, USA)
DMEM Medium	Gibco (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Kälberserum (BS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Penecillin/Streptomycin (PSA)	Gibco (Karlsruhe)
RPMI1640	Gibco (Karlsruhe)
Soybean Trypsin Inhibitor	Worthington (Lakewood, USA)
Trypsin /EDTA für die Zellkultur (0.05%)	Gibco (Karlsruhe)
Vitrogen100	Celtrix (Landsdale, USA)
Zellkulturschalen (6cm, 10cm)	Greiner (Frickenhäusen)
Zellkulturflaschen	Nunc (Langenselbold)

2.1.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

HUVEC Medium

500 ml RPMI1640
1% (v/v) PSA
25µg/ml Ceftazidim
15% (v/v) BS
25 mg Heparin
25 mg BPE

R10 Medium

500ml RPMI1640
2mM L-Glutamin
10% (v/v) FCS

SMC Kulturmedium

500ml DMEM mit 4% Glukose und L-Glutamin
1% (v/v) PSA
25µg/ml Ceftazidim
10% (v/v) FCS
2mM Glutamin
1mM Pyruvat

SMC Isolationsmedium

500ml DMEM mit 4% Glukose und L-Glutamin
1% (v/v) PSA
25µg/ml Ceftazidim
15% FCS
2mM Glutamin
1mM Pyruvat

Enzymmix für SMC Isolation

50ml DMEM Medium 4% Glukose + 1% Penecillin/Streptomycin
100mg BSA
50mg Collagenase 3
18,75mg Soybean Trypsin Inhibitor
6,25mg Elastase Typ III

Gelatine für das Beschichten der Zellkulturflaschen zur HUVEC Kultivierung

2% (w/v) Rindergelatine in A.bidest geben und autoklavieren

Heparin Stock (100x)

250mg Heparin in 50 ml serumfreien RPMI1640 Medium lösen und sterilfiltrieren.

2.1.4 Reagenzsysteme

<u>System</u>	<u>Firma</u>
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Schwerte)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (München)
Hemacolor® Schnelfärbetest	Merck (Darmstadt)
MCP-1 Single Analyte ELISArray Kit	SABiosciences (Frederick, USA)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Redextract-N-Amp PCR Reaction Mix	Sigma (München)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
iQ SYBR-Green Supermix	BioRAD (München)

2.1.5 Plastikwaren / Verbrauchswaren

FACS-Röhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld)
Perfusionsbesteck (Butterfly) Vasuflo 23G	Dispomed (Gelnhausen)

2.1.6 Lösungen und Puffer

<u>ACK Puffer:</u>	0,15M NH_4Cl 1mM KHCO_3 0,1mM Na_2EDTA
<u>Blot Waschpuffer:</u>	0,5% (w/v) Magermilchpulver 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
<u>Destain I:</u>	50% (v/v) Ethanol 7% (v/v) Eisessig
<u>Destain II:</u>	5% (v/v) Ethanol 7% (v/v) Eisessig
<u>Eosin Lösung:</u>	1% (v/v) Eosin in A.dest. Bei älteren Lösungen 1-2 Tropfen Eisessig pro Küvette.
<u>FACS Puffer:</u>	1% (w/v) Rinderserum Albumin in PBS 1% (v/v) Na-Azid
<u>Gesättigte wässrige Pikrinsäure:</u>	15g Pikrinsäure in 950ml A.dest. 2-3 Tage stehen lassen, den Überstand verwenden.
<u>PBS:</u>	9,55g mit A.bidest auf 1000ml auffüllen und autoklavieren
<u>Peroxidase Block:</u>	3% (v/v) H_2O_2 in MeOH
<u>Picro-Siriusrot Lösung:</u>	0,1% Siriusrot in gesättigter, wässriger Pikrinsäure
<u>SDS-Puffer:</u>	1% (w/v) SDS in ddH ₂ O

<u>TAE Puffer (50x):</u>	2M Tris 0,05M EDTA 5,7% (v/v) Eisessig ad 1000ml ddH ₂ O
<u>Transferpuffer:</u>	25mM Tris 192 mM Glyzin 20% (v/v) Methanol
<u>Tris/EDTA Hitzepuffer:</u>	10mM Tris 1mM EDTA in A.dest. pH 9.0
<u>Zitronensäurepuffer:</u> (Immunhistochemie)	18mM Zitronensäure 82mM Tri-Natriumcitrat ad. 1L mit A. dest. pH 6.0
<u>4x SDS Probenpuffer:</u>	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 0,01% (v/v) Glyzerol 2% (w/v) SDS 5% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,05% (w/v) Bromphenolblau

2.1.7 Tierfutter

Western-Type-Diät (Firma Altromin)

21% (w/v) Fett

0.15% (w/v) Cholesterol

19.5% (w/v) Casein ohne Natriumcholate

Normales Haltungsfutter (Firma ssniff)

58% (w/v) Kohlenhydrate

33% (w/v) Protein

9% (w/v) Fett

2.1.8 Antikörper

<u>Western Blot</u>		
	Rabbit anti human pAkt Ser ⁴⁷³	Cell Signaling
	Rabbit anti human peNOS Ser ¹¹⁷⁷	Cell Signaling
	Rabbit anti human eNOS	Alexis
	Sek. AB: Peroxidase labelled anti-rabbit IgG (H&L)	Vector

<u>FACS</u>		
	FITC-anti mouse CD4	Acris GmbH
	FITC-anti mouse CD45	BD Pharmingen
	PE-anti mouse CD8a	BD Pharmingen
	PE-anti mouse CD45R/B220	BD Pharmingen
	Rat anti mouse F4/80 FITC	AbD Serotec
	PE anti mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr1)	BD Pharmingen
	purified anti-mouse CD16/CD32 (mouse Fc Block)	BD Pharmingen

<u>Immunhistochemie</u>		
CD3	Rabbit anti human CD3	Dako
	Neg. Kontrolle: Rabbit IgG	Dako
	Sek. AB: Goat anti rabbit Biotin	Dianova
SMC	Mouse anti-human smooth muscle-actin Clone 1A4 IgG2a kappa	Dako
	Neg. Kontrolle: Mouse IgG2a	Dako
	Sek. AB: Rabbit anti mouse IgG2a Biotin	Zytomed
MAC-2	Rat anti mouse Mac-2	Cedarline Laboratories
	Neg. Kontrolle: Rat gamma Globulin	Jackson Immuno
	Sek. AB: Goat anti rat IgG Biotin	Sigma
MCP-1	Goat anti mouse MCP-1 (M-18)	Santa Cruz
	Neg. Kontrolle: Goat IgG	Jackson Immuno
	Sek. AB: Rabbit anti goat IgG (H+L) Biotin	Jackson Immuno

2.1.9 Geräte

Gerät

Firma

Autoklav	Thermo Scientific Varioclav
Brutschrank	NUAIRE IR Autoflow CO2 Water-jacketed Incubator
Eismaschine	Scotsman AF-100
Elisa Reader	Bio-TEK Synergy HT
Entwickler für Röntgenfilme	MS Laborgeräte, Optimax TR
FACS: Coulter Epics XL	Beckmann Coulter
Feinwaage	Scaltec SBC21
Geldokumentation (Drucker)	Mitsubishi P93D
Geldokumentation (Kamera)	Kodak EDAS 290
Grobwaage	Sartorius BL 1500
Lichtmikroskop	Olympus BX51

Magnetrührer	IKAMAG RCT
Mikroskop-Kamera	Zeiss Axio Cam
PCR Cycler	MJ Research Inc. PTC-100
	MJ Research Inc. PTC-200
pH Meßgerät	WTW Ivolab pH Level2
Powersupply	BioRAD Power Rack 300
Real Time PCR Cycler	Zellzählung:
	BioRAD iCycler iQ
Sterilbank	NUAIRE ClassII
Sterilisationsschrank	MMM Stericell
Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer comfort
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R
UV Tisch	Herolab UVT-28M
Wasserbad	Gesellschaft f. Labortechnik GFL1083
Western Blot System	BioRAD Mini Protean II
Z2	Beckmann Coulter
Zellkulturzentrifuge	Eppendorf 5810 R

2.1.10 Mäusstämme

C57Bl6 (Jackson Laboratory)

ApoE^{-/-} (Jackson Laboratory)

S1P₃^{-/-} (zur Verfügung gestellt von Prof. J. Chun, Scripps Institute, La Jolla, USA)

ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} (Eigene Zucht)

2.1.11 Zelllinien

Human Umbilical Vain Endothelial Cells (HUVEC)

Glatte Muskelzellen der Ratte

Glatte Muskelzellen der Maus

2.1.12 Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: Hefe Extrakt (5 g/l)
 Bacto Trypton (10 g/l)
 NaCl (5 g/l)

2.2 Methoden

2.2.1 Blutanalysen

Das Blut wurde retrobulbär entnommen, bevor die Tiere unter Narkose durch Trennen des Zwerchfells getötet wurden. Blutwerte und Lipidprofile wurden mit dem Scil vet abc und Reflotron (scil animal care company) bestimmt.

2.2.2 FTY720 Fütterung

FTY720 wurde ApoE^{-/-} Mäusen in einer Dosis von 1.25 mg/kg/Tag über das Trinkwasser verabreicht. Zu Beginn der Fütterung waren die Tiere 4 Wochen alt. Eine Woche nach Start der FTY720-Fütterung wurden die Tiere für 20 Wochen auf Western Type Diät gesetzt.

2.2.3 Quantifizierung von atherosklerotischen Läsionen in der BCA und der Aortenwurzel

Die Mäuse wurden unter Narkose durch Trennen des Zwerchfells getötet. Anschließend erfolgte eine Perfusion über eine Kanüle im linken Ventrikel mit PBS und danach eine Perfusionsfixierung mit 4,5 % Formalin (Roti Histofix). Die Brachiocephalica (*A. brachiocephalica*, BCA) wurde von der Bifurkation der Aorta bis zur Abzweigung der rechten Schlüsselbeinarterie (*A. subclavia dextra*) und der rechten gemeinsamen Halsschlagader (*A. carotis communis dextra*) präpariert, entnommen und in ein Paraffinblöckchen für die Histologie eingebettet. Die gesamte BCA wurde in 5 µm dicken Schnitten auf Objektträger aufgezogen. Von einem zufälligen Startpunkt innerhalb der ersten 14 Schnitte ab dem ersten vollständigen Querschnitt wurde ein Schnitt herausgesucht und ab dort alle 75 µm ein weiterer. Diese Schnitte wurden dann mit Hämalaun und Eosin (H&E) gefärbt. Die zur Auswertung von Läsionsfläche und Gefäßfläche benötigten Bilder wurden mit einer Zeiss Axio Cam aufgenommen, und Läsionsgrößen mit Hilfe der AxioVision 4.4 Software (Carl Zeiss Vision GmbH) bestimmt. Das Volumen der Läsionen der BCA errechnete sich aus der stereologischen Formel von Cavalieri: $\sum (\text{Läsionsflächen}) \cdot (\text{Distanz zwischen den Schnitten; } 75 \text{ } \mu\text{m})$. Die Aortenwurzel wurde ebenfalls in Paraffin eingelegt und die Läsionsfläche sowie die Gefäßfläche aus 4 konsekutiven,

5 µm dicken Schnitten ermittelt, wie bereits oben für die BCA beschrieben. Die Schnitte der Aortenwurzel hatten einen Abstand von 40 µm zueinander und zeigten die komplette Fläche der Aortenwurzel sowie einen Querschnitt aller 3 Klappen. Die zur Auswertung herangezogene *volume fraction* der Läsion berechnet sich aus dem Quotient des Volumens der Läsion $[\sum (\text{Läsionsflächen inklusive Klappenfläche}) * (\text{Distanz zwischen den Schnitten; } 40 \mu\text{m})]$ und des Volumens des Gefäßes $[\sum (\text{Gefäßflächen}) * (\text{Distanz zwischen den Schnitten; } 40 \mu\text{m})]$.

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Hämalaun & Eosin (H&E)

Die Schnitte wurden in Xylol für 3x10 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils eine Minute in 2x 100%, 2x 96% 1x 70% EtOH und anschließend in A. dest. überführt. Nach ca. einer Minute wurden sie für 1 min in Hämalaun-Lösung gegeben, anschließend unter fließendem Leitungswasser abgespült und für 10 min in Leitungswasser gebläut. Nun wurden die Schnitte für 1 min in A. dest. inkubiert und dann kurz (30 sec) in die Eosin-Lösung getaucht. Danach folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 2x A. dest. (kurz), 3x 70% (kurz), 2x 96% und 2x 100% EtOH für jeweils eine Minute und Überführung in Xylol. Die Schnitte wurden mit Vitroclud eingedeckelt.

2.2.4.2 Sirius Rot

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert (2x 10 min, 2x 1 min). Es folgte eine absteigende Alkoholreihe (2x 100%, 1x 96% 1x 70% EtOH), nach der die Schnitte kurz in A. dest. gespült und sofort für 10 min in Hämalaun überführt wurden. Nach dem Bläuen in Leitungswasser für 10 min wurden die Schnitte für 30 min in die Picro-Siriusrot-Lösung gestellt. Nach dem schnellen Entwässern für 3x 10 min in 100% EtOH (bis keine Schlieren mehr zu sehen waren) wurden die Schnitte in Xylol überführt und mit Vitroclud eingedeckelt.

2.2.5 Immunhistochemie

Die für die immunhistologischen Färbungen benötigten Schnitte wurden, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, ausgewählt (15 Schnitte mit einem Abstand von 75 µm

zueinander), entparaffiniert und bis in A.dest. überführt (siehe Punkt 2.2.4.1). Nach dem Peroxidase-Block für 10 min bei Raumtemperatur (RT) wurden die Schnitte in den Küvetten 3x mit PBS gewaschen. Die primären Antikörper werden in 3% Serum der Spezies des sekundären Antikörpers verdünnt und auf den Schnitten für 1 h (Mac-2, SMC und MCP-1) oder für 30 min (CD3) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die biotinylierten sekundären Antikörper für 30 min auf die Schnitte gegeben. Erneut wurden die Schnitte 3x mit PBS gewaschen und anschließend 45 min mit der an Streptavidin gekoppelten Peroxidase (Streptavidin-POX) inkubiert und mit Diaminobenzidin visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

2.2.5.1 Makrophagen (Mac-2)

Entparaffinierung und weiteres Vorgehen wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben.

2.2.5.2 Glatte Muskelzellen (SMC)

Entparaffinierung und weiteres Vorgehen wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben.

2.2.5.3 T-Lymphozyten (CD3)

Nach der Entparaffinierung erfolgte eine Antigendemaskierung für 20 min in Tris/EDTA Hitzepuffer bei 97°C im Wasserbad. Die Schnitte wurden anschließend in einem kalten Wasserbad langsam bis auf RT abgekühlt. Es folgte die weitere Behandlung mit Peroxidase-Block und primärem sowie sekundärem Antikörper wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben.

2.2.5.4 Macrophage Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

Die MCP-1 Färbung benötigte nach der Entparaffinierung eine Antigendemaskierung für 45 min in Zitronensäurepuffer (pH 6.0) bei 97°C im Wasserbad. Nachdem die Schnitte im kalten Wasserbad bis auf RT abgekühlt waren, wurden sie mit dem Peroxidase-Block für 10 min bei RT inkubiert und wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Beschichten von Membranen sowie Zellkulturflaschen und -schalen mit Vitrogen100 und Gelatine

Pro Polycarbonat Membran wurden 965 µl 0,05 M Essigsäure mit 35 µl Vitrogen100 in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vermischt. Die zu beschichtende Membran wurde in eine 10 cm Zellkulturschale gelegt und mit der Essigsäure-Vitrogen100 Mischung bedeckt. Das Gemisch wurde mit einer Pipette wieder abgenommen und die Membran vorsichtig mit einer Pinzette umgedreht. Dann wurde die Mischung wieder auf die Membran gegeben und über Nacht getrocknet. Für die Beschichtung von Flaschen und Schalen wurde dieser Ansatz verdreifacht. Das Gemisch wurde in die Flaschen /Schalen gegeben und kurz durch schwenken verteilt. Der Überstand wurde wieder abgenommen, und die Flaschen/Schalen 15 min oder über Nacht trocknen gelassen. Für die Gelatine-Beschichtung von Zellkulturflaschen und -schalen wurde 2% Gelatine im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Danach wurden 5 ml Gelatine in eine Flasche/Schale gegeben und durch schwenken verteilt. Der Überschuss wurde abgenommen und die Beschichtung für mindestens 15 min trocknen gelassen.

2.2.6.2 Kultivierung von glatten Muskelzellen (Maus und Ratte)

Alle Säugetierzellen wurden in DMEM Medium (4,5g Glukose und L-Glutamin) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchte kultiviert. Die Zellen wurden je nach Konfluenz alle 3-5 Tage 1:3 umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA (75cm² Flasche) 5 min bei 37°C durch vorsichtiges Klopfen an den Flaschenrand abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Medium vereinzelt und in neue Flaschen oder Schalen überführt.

2.2.6.3 Kultivierung von Endothelzellen der Nabelschur (HUVEC)

Die Zellen wurden in mit Gelatine beschichteten Flaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchte in RPMI1640 Medium (4,5g Glukose) kultiviert. Die Zellen wurden etwa alle 3 Tage 1:3 in neue Flaschen umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit 5ml Trypsin/EDTA

(75cm² Flasche) 5 min bei 37°C abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium vereinzelt und in neue mit Gelatine beschichtete Flaschen oder Schalen überführt.

2.2.6.4 SMC Präparation von der Maus

Von 6-7 Tieren wurde die Aorta entnommen und bis zur Verarbeitung in DMEM Medium mit 1% PSA aufbewahrt. Anschließend wurden sie für 30 min bei 37°C mit einem Enzymmix verdaut und die Adventitia abgezogen. Ab diesem Punkt wurden alle weiteren Schritte steril durchgeführt. Die sauberen Aorten wurden in eine neue 35 mm Zellkulturschale mit PBS überführt, längs geöffnet und in kleine Stücke von ca. 3x3 mm geschnitten. Diese Stücke wurden nun mit einer Pipette in ein 15 ml Falcon-Tube transferiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 290 x g und RT wurde der Überstand abgenommen und 2 ml vorgewärmter Enzymmix zu den Gefäßstücken pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 3 h in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 90 min wurde überprüft, ob sich die Gefäßstücke bereits aufgelöst hatten. Wenn dies der Fall war wurde die Isolation fortgeführt. Der Zell-Enzymmix-Ansatz wurde resuspendiert und für 10 min bei 290 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0,5 ml SMC-Isolationsmedium resuspendiert und in eine mit Vitrogen100 beschichtete 60 mm Zellkulturschale überführt in der bereits 5 ml SMC-Isolationsmedium vorgelegt waren. Die Zellen wurden 3-4 Tage unter normalen Zellkulturbedingungen ruhig stengelassen, um ein Adhieren und Ausbreiten der SMC zu ermöglichen. Diese Zellen wurden nur mit Isolationsmedium kultiviert.

2.2.6.5 Migration (Boyden Kammer)

Bei den für die Migrationsexperimente benötigten Zellen wurden 24 h vor dem Experiment das Medium auf SMC Kulturmedium mit 1% FCS gewechselt, und eine oder mehrere Membranen mit Vitrogen100 beschichtet. Alle für das Experiment benötigten Lösungen wurden am Tag des Experiments frisch angesetzt. Dazu wurden die verwendeten Stimulanzen in DMEM ohne FCS mit 0,25% BSA gebrauchsfertig verdünnt. Für das Experiment wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und bei 290 x g für 5 min bei 4°C pellettiert. Das Zellpellet wurde in einem möglichst kleinen Volumen DMEM mit 0,25% BSA aufgenommen, und die Zellzahl

wurde mit dem Z2 Zellzählgerät bestimmt. Man benötigte Zellkonzentrationen von 290-570 Zellen/ μ l was 10.000 – 20.000 Zellen/35 μ l entsprach. Für jedes verwendete Stimulans wurden Dreifachwerte angesetzt. Zuerst wurden die unteren Wells der Boyden Kammer mit den in DMEM+0,25% BSA verdünnten Stimuli gefüllt. Darauf wurde dann vorsichtig und luftblasenfrei die beschichtete Membran gelegt, die zuvor mit 1 ml PBS angefeuchtet wurde. Auf die Membran wurde zur Abdichtung eine Gummimatte aufgelegt und auf diese das Oberteil der Kammer. In das Obere Well wurden dann 10.000 – 20.000 Zellen gegeben. Die Migration der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei Zellkulturbedingungen für 4 h. Dabei wanderten die Zellen durch die Poren in Richtung des jeweiligen Stimulus. Danach wurde die Kammer auseinander gebaut und die Membran in MeOH fixiert. Anschließend wurde die Oberseite der Membran durch abschaben von nicht migrierten Zellen befreit und mit Hilfe des Hemacolor Kits gefärbt. Nachdem sie getrocknet war wurde sie in Streifen geschnitten so dass sich die jeweiligen Dreifachwerte auf einem Streifen befanden. Die Membranstreifen wurden dann mit Vitroclud auf einem Objektträger eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte durch die Auszählung der Zellkerne der migrierten Zellen in einem Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung.

2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Von dem retrobulbär entnommenen Blut wurden pro Tier und Färbung jeweils 50 μ l verwendet. Das Blut wurde in FACS-Röhrchen gegeben und die Erythrozyten mit 2 ml Pharmlyse 5 min bei RT und anschließend 5 min auf Eis lysiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Proben, die für F4/80 gefärbt werden sollten wurden 5 min bei Raumtemperatur mit 2,5 μ g/ml *mouse Fc-Block* inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l FACS-Puffer und die entsprechenden Antikörper hinzugefügt. (CD4 (1,5 μ g/ml), CD8 (3 μ g/ml), CD45R/B220 (3 μ g/ml) B220 (3 μ g/ml), Ly-6C&Ly-6G (Gr1) (3 μ g/ml), CD45 (2,5 μ g/ml), F4/80 (2,5 μ g/ml)). Nach einer Inkubation von 20-25 min im Dunkeln bei RT wurden die Proben mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, in 400 μ l FACS-Puffer aufgenommen und am Epix XL analysiert.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 Gewinnung von genomischer DNA aus Blut

Um zu kontrollieren ob eine Knochenmarks-Transplantation erfolgreich war, und alle Blutzellen den transplantierten Genotyp tragen, wurde aus dem Blut der Tiere DNA gewonnen und diese mittels PCR überprüft. Zur Gewinnung von DNA aus dem Blut wurde das QIAamp DNA Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.8.2 RNA Präparation

Für die Gewinnung von RNA aus kultivierten Zellen wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden direkt in der Zellkulturschale lysiert und dann den Herstellerangaben entsprechend weiter behandelt.

2.2.8.3 Reverse Transkription

Um aus RNA cDNA zu gewinnen wurde das Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas verwendet. Das Protokoll wurde wie vom Hersteller angegeben angewendet.

2.2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von K.B. Mullis Mitte der achtziger Jahre entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient dazu, spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu amplifizieren¹²⁴. Durch zwei Primer werden die Bereiche der DNA flankiert, die amplifiziert werden sollen, während die Reaktion selbst durch eine hitzestabile Polymerase katalysiert wird. Durch das Durchlaufen mehrerer Zyklen bestehend aus Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges, Anlagerung der Primer und Verlängerung des Matrizenstranges resultiert eine exponentielle Vervielfältigung der DNA.

Die von den Transplantationstieren aus dem Blut gewonnene DNA wurde als Template zusammen mit Primern, Wasser und Redextract-N-Amp PCR Reaction Mix in dem bereits die Polymerase sowie Puffer und dNTP enthalten sind, in eine PCR Platte pipettiert und über 35 Zyklen amplifiziert (Abb. 8) Die so erhaltenen PCR Produkte wurden auf 4% Agarosegele aufgetragen, um sie mittels Elektrophorese der Größe nach aufzutrennen.

ApoE ^{-/-}			
Step 1:	94°C	3 min	
Step 2:	94°C	20 sec	35 Zyklen
	68°C	40 sec	
	72°C	2 min	
Step 3:	72°C	10 min	
Step 4:	4°C	8	
S1P ₃ ^{-/-}			
Step 1:	94°C	5 min	
Step 2:	94°C	30 sec	35 Zyklen
	56°C	1 min	
	72°C	1 min	
Step 3:	72°C	10 min	
Step 4:	4°C	8	

Abbildung 8: PCR Programm für die Genotypisierung von ApoE^{-/-} und S1P₃^{-/-} Tieren

Benutzte Primer für ApoE^{-/-} : ApoE1, ApoE2, ApoE3

Benutzte Primer für S1P₃^{-/-} : B3-WT, B3-back, Hx-1

2.2.8.5 Primer

Tabelle1: Primersequenzen für die Genotypisierung von ApoE^{-/-}, S1P₃^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Mäusen

Primer	Sequenz
ApoE-1	5´-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3´
ApoE-2	5´-TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C-3´
ApoE-3	5´-GCC GCC CCG ACT GCA TCT-3´
B3-WT	5´-TGG TGT GCG GCT GTC TAG TCA A-3´
B3-back	5´-ATC GAT ACC GTC GAT CGA CCT-3´
Hx-1	5´-CAC AGC AAG CAG ACC TCC AGA-3´

2.2.8.6 Agarosegele

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach kurzer Abkühlungszeit mit Ethidium-Bromid versetzt. Anschließend wurde die flüssige Gelmasse in einen geschlossenen Gelschlitten gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Nach der Polymerisierung des Gels wurde der Probenkamm entfernt, und das Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Größenauftrennung erfolgte bei 120V für 1,5 h.

2.2.8.7 Real Time PCR

Die Real Time PCR ist eine Weiterentwicklung der Standard PCR und dient zur quantitativen Bestimmung der Ziel-DNA. Dazu wird ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green) eingesetzt, der während der DNA Amplifizierung in die neu gebildete DNA interkaliert. Dadurch steigt das Fluoreszenz-Signal an und wird am Ende des jeweiligen Zyklus detektiert. Die Quantifizierung wird anhand des Threshold Cycle, oder CT Wertes vorgenommen. Dieser Wert wird erreicht wenn das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. In diesem Bereich verläuft die Amplifikation exponentiell. Für die Quantifizierung der Genexpression wurde SYBR-Green wie vom Hersteller angegeben verwendet sowie spezielle Primer für MCP-1 und GAPDH der Firma R&D Systems eingesetzt. Für jede Probe wurden Dreifachwerte bestimmt (Abb.9)

Real Time PCR			
Step 1:	95°C	3 min	40 Zyklen
Step 2:	95°C	30 sec	
	50°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Step 3:	95°C	1 min	
Step 4:	50°C	1 min	
Step 5:	50°C	10 min	
Step 6:	4°C	8	

Abbildung 9: PCR Programm für eine Real Time PCR

2.2.9 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) für Proteine

2.2.9.1 Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt von Zell-Lysaten zu bestimmen, wurde das *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce verwendet. Dazu wurden Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 1:50 vermischt. Von dieser Mischung wurden dann 200 µl zu 1 µl Zell-Lysat in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 595 nm im Synergy HT gemessen, und die Konzentration mittels einer BSA Eichreihe bestimmt.

2.2.9.2 SDS-Gele

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen wurde die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli angewendet¹²⁵. Für die 1,5 mm dicken SDS-Gele wurde das Mini-Protean-II System verwendet. Für die Trenngele wurden die Lösungen, wie in Tab. 2 angegeben, zusammenpipettiert und zwischen die Glasplatten gegossen. Das noch flüssige Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um einen glatten Abschluss zu gewährleisten. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen, die Lösung für das Sammelgel zusammen pipettiert (Tab. 2) und auf das Trenngel gegossen. Der Probenkamm wurde anschließend sofort in das Gel gesteckt. Nachdem das Sammelgel vollständig auspolymerisiert war konnte der Probenkamm entnommen werden.

2.2.9.3 SDS Gelelektrophorese

Je nach Größe der darzustellenden Proteine wurden entweder 7,5%, 10% oder 12% Gele verwendet. Die aufzutragenden Zell-Lysate wurden mit 4x reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. In die Geltaschen wurden nun jeweils gleiche Mengen an Protein aufgetragen (zwischen 20 und 50 µg). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Puffer bei 130 V für 90-120 min. Als Größenstandart wurde der *Prestained Protein Marker Broad Range* (New England Biolabs) benutzt. Dieser zeigt die Größenfragmente 175; 83; 62; 47,5; 32,5; 25; 16,5; und 6,5 kDa an.

Tabelle 2: Pipettierschema für SDS Gele

Angegeben sind die Mengen für 2 Gele in dem Mini-Protean II System.

Lösungen	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	12 %	4%
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	6,2 ml	8,2 ml	9,8 ml	1,32 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	6,2 ml	6,2 ml	6,2 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	2,6 ml
A. bidest.	12 ml	10 ml	8,4 ml	5,7 ml
10% (w/v) SDS	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,24 ml
8% (w/v) APS	156 µl	156 µl	156 µl	64 µl
TEMED	26 µl	26 µl	26 µl	10 µl

2.2.10 Western Blot

Der Western Blot zeichnet sich dadurch aus, dass Proteine, die durch SDS-Page der Größe nach aufgetrennt wurden, durch ein elektrisches Feld auf eine Trägermembran mit hoher Proteinaffinität übertragen werden. Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde mittels des Mini-Trans-Blot Cell-System vorgenommen. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese vorsichtig aus den Glasplatten gelöst und in Transferpuffer für 5 min bei RT äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol geschwenkt und anschließend, wie auch das Whatman-Papier, in Transferpuffer überführt. Der Western Blot wurde, wie in Abb. 10 gezeigt, zusammengesetzt.

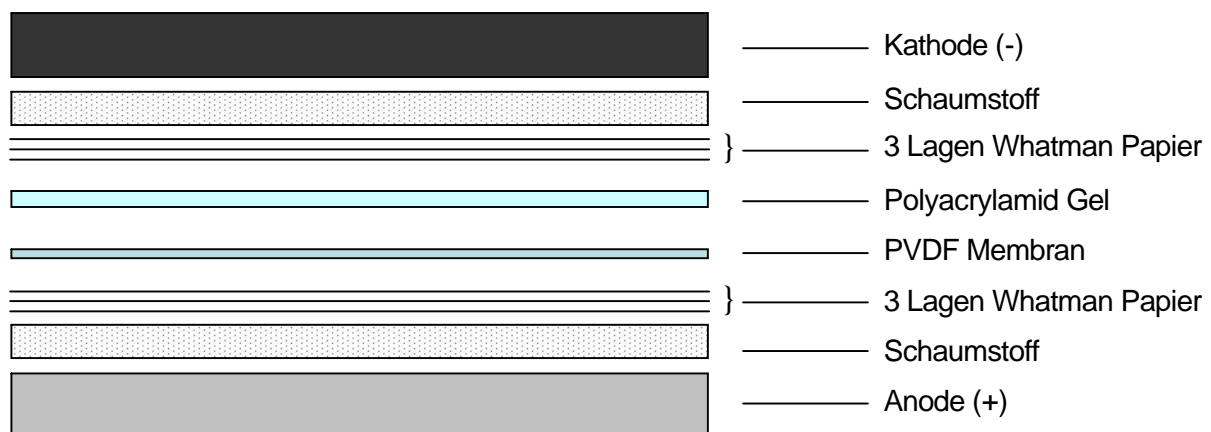


Abbildung 10: Schematische Darstellung zum Aufbau eines Western Blots

Der Transfer erfolgte bei 30 V für 16 h oder bei 100 V für 1h. Nach erfolgreichem Transfer wurden die Membranen in Methanol geschwenkt und getrocknet, während die Gele wurden 20 min - 1 h in Coomassie gefärbt wurden. Das Entfärben der Gele erfolgte zunächst für etwa 20 min mit Destain I, wobei die Lösung mehrfach gewechselt wurde. Anschließend wurden die Gele mit Destain II weiter entfärbt. Durch den Vergleich der Banden auf dem Gel ließ sich abschätzen, ob gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden. Für die Antikörper Detektion der Proteine auf der Membran wurde diese zuerst in Methanol geschwenkt, um die Proteine auf der Membran zu fixieren. Danach wurde die Membran für 5 min in PBS geschwenkt um das Methanol wieder zu entfernen. Anschließend wurde sie für 1 h in 5% Milch/PBS bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach kurzem Schwenken in PBS erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 0,5% Milch/PBS für 1 h bei 37°C oder bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran 3-mal mit Waschpuffer für jeweils 5 min gewaschen und im sekundären Antikörper in 0,5% Milch/PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit dem *Enhanced Chemoluminescence Kit* laut Herstellerangaben inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Röntgenfilm.

2.2.11 Messung von MCP-1

MCP-1 in Zellkulturüberständen wurde mittels des *Single Analyte ELISArray Kit* der Firma SABiosciences gemessen. Der Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.12 Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen

Um eine sterile Peritonitis auszulösen wurde 3% Thioglykollat in A. bidest. gelöst und die Lösung im Wasserbad zum kochen gebracht bis ein Farbumschlag nach gelb zu beobachten war. Die nun gelbe Lösung wurde durch autoklavieren sterilisiert. Den Mäusen wurden jeweils 1 ml der sterilen Lösung intraperitoneal (IP) injiziert, und nach 96 h wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurden je Tier 4 ml PBS und 2 ml Luft IP injiziert, der Bauch der Maus vorsichtig massiert, um die ins Peritoneum rekrutierten Makrophagen zu lösen, und das PBS / Makrophagen Gemisch mit einer Spritze aus dem Bauchraum entnommen. Zuletzt wurde der Bauch eröffnet um auch letzte Reste PBS /

Makrophagen entnehmen zu können. Die so gewonnenen Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 4°C, 300 x g), der Überstand zur S1P-Bestimmung aufbewahrt und das Pellet in 4 ml ACK Puffer aufgenommen um Erythrozyten zu lysieren.. Nach der Lyse bei RT für 2 min wurden die Zellen abermals abzentrifugiert und in PBS aufgenommen. Nun wurden die Zellen mittels Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer gezählt und danach in die jeweiligen Experimente eingesetzt.

2.2.13 S1P-Bestimmung im Peritoneal-Exsudat

Die Bestimmung von S1P erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Gräler mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography* oder HPLC).

2.2.14 Knochenmarks-Transplantation

Um die Wechselwirkungen zwischen Zellen aus dem Blut und dem Endothel bei S1P₃ KO Tieren besser untersuchen zu können, wurde das Knochenmark von Wildtyp-Tieren den KO-Tieren transplantiert und *vice versa*. Die Empfängertiere wurden mit 11 Gray subletal bestrahlt, um das Knochenmark vollständig zu zerstören. 24 h nach der Bestrahlung werden 1×10^7 Knochenmarkszellen des Spendertieres retroorbital in das Empfängertier injiziert. Nach erfolgter Injektion wurden die Tiere 12 Wochen mit Western-Type-Diät gefüttert. Anschließend wurde von den atherosklerotischen Läsionen der Aortenwurzel das Volumen bestimmt und die zelluläre Zusammensetzung immunhistologisch analysiert. Um die Zellen des Knochenmarks zu erhalten, wurden den Spendertieren beide Femuren und beide Tibien entnommen, mit der Pinzette sauber präpariert und in ein 50 ml Falcon-Tube mit 15 ml R10 Medium gegeben. Um ein möglichst steriles Umfeld zu schaffen, erfolgte die weitere Aufarbeitung der Knochen unter einer Sterilbank, wo sie für 1-2 min in 70% Alkohol eingelegt wurden. Danach wurden mit einer Schere die Enden der Knochen abgetrennt und der so beidseitig eröffnete Knochen mit 5 ml R10 Medium mit einer 25G Kanüle durchgespült. Die so gewonnene Knochenmarks-Suspension wurde über ein 70 µm Zellsieb gegeben, um eventuell vorhandene Knochenstückchen oder anderes Gewebe zu entfernen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g bei RT wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 ml

ACK-Puffer zur Erythrozyten Lyse resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT folgte eine weitere Zentrifugation von 5 min bei 300 x g wonach das Pellet wurde nun in sterilem PBS gelöst und die Zellzahl bestimmt wurde. Anschließend wurde die Zellzahl mit PBS so eingestellt, dass die zu transplantierenden Zellen in einem Volumen von 200µl injiziert werden konnten. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in LB Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert, um eine bakterielle Kontamination der Zellen auszuschließen.

3 Ergebnisse

3.1 Das S1P-Analog FTY720 inhibiert die Atherosklerose in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-})

3.1.1 FTY720 verringert die Größe der atherosklerotischen Läsion und verändert ihre zelluläre Zusammensetzung

Um den Effekt von FTY720 auf die Atherosklerose zu bestimmen, wurden ApoE^{-/-} Mäuse 20 Wochen lang mit einer Cholesterin-reichen Diät gefüttert (Western-Type-Diät), wobei einer Gruppe FTY720 über das Trinkwasser verabreicht wurde (1.25 mg/kg Körpergewicht/Tag), der anderen Gruppe nicht. Als Nachweis für die Wirksamkeit von FTY720 wurde die für die Substanz beschriebene Lymphopenie¹²⁶ herangezogen. Dazu wurden allen Tieren bei der für die Untersuchung der Atherosklerose vorgesehenen Aufarbeitung Blut aus dem Orbitalvenenplexus entnommen und im Hämatozytometer gemessen, sowie anschließend einer FACS-Analyse unterzogen. Bestimmt wurden Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, B- und T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺), Neutrophile und Monozyten. Bei allen FTY720-behandelten Tieren zeigte sich eine klare Lymphopenie, die vor allem T-Zellen (Abb. 11 und Tab. 3) und, etwas abgemildert, B-Zellen betraf. Das Plasmacholesterin wurde nicht beeinflusst.

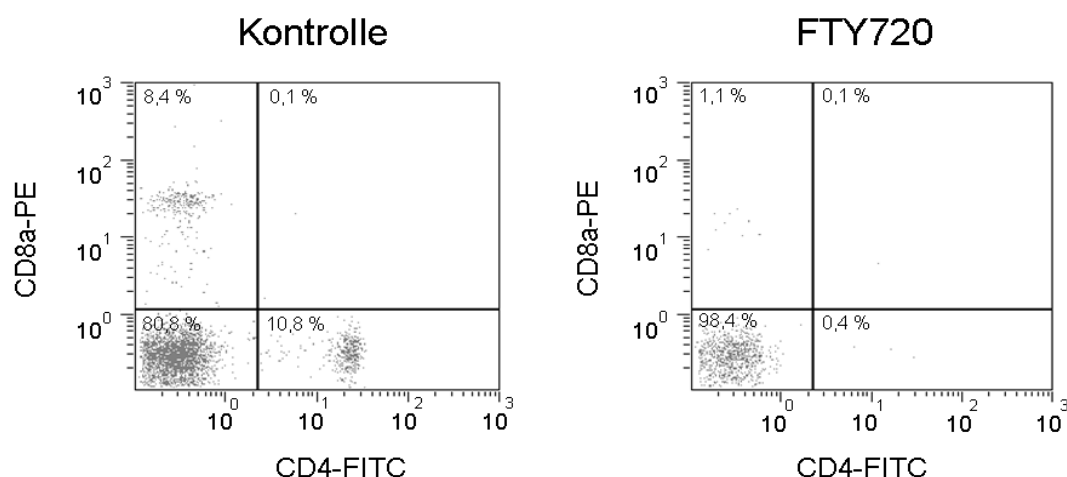


Abbildung 11: Periphere Lymphopenie bei FTY720 gefütterten Tieren

FACS-Analyse des Blutes von einem Kontroll-Tier und einem mit FTY720 gefütterten Tier. Bei dem behandelten Tier zeigten sich deutlich verminderte CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten. Gezeigt ist je ein exemplarisches Beispiel aus 7 Kontroll-Tieren bzw. 9 FTY720-behandelten Tieren.

Tabelle 3: Blutparameter von ApoE^{-/-} mit und ohne FTY720 Behandlung

Periphere Blutparameter wurden nach Blutentnahme aus dem Orbitalvenenplexus mittels Scil vet abc bestimmt. Mit FTY720 gefütterte Tiere zeigten eine Lymphopenie, während alle anderen Parameter keine Unterschiede aufwiesen.

Parameter	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} +FTY720	
RBC [10 ⁶ /ml]	8400 ± 220	8500 ± 420	n.s.
WBC [10 ⁶ /ml]	3.2 ± 0.48	1.9 ± 0.22	p<0.05
Lymphozyten [10 ⁶ /ml]	2.0 ± 0.3	0.9 ± 0.13	p<0.05
Monozyten [10 ⁶ /ml]	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	n.s.
Granulozyten [10 ⁶ /ml]	1.1 ± 0.19	1.0 ± 0.08	n.s.
Plättchen [10 ⁶ /ml]	1153 ± 120.26	937 ± 13	n.s.
Cholesterin [mg/dl]	685.9 ± 101.83	557.6 ± 104.23	n.s.

Für die Quantifizierung des Volumens der atherosklerotischen Läsionen wurde die Plaqueentwicklung in der *A. brachiocephalica* (BCA) herangezogen. Die BCA ist eine anatomische Struktur, die sich durch ihren definierten Beginn und Ende (Abzweigung aus der Aorta bzw. Bifurkation in *Aa. carotis* und *brachialis*) hervorragend für die stereologische Bestimmung von Volumina (hier von atherosklerotischen Läsionen) nach der mathematischen Formel von Cavalieri eignet $[(\sum \text{Läsionsflächen}) * (\text{Distanz zwischen den Schnitten } (75 \mu\text{m}))]$. Der Startpunkt wurde definiert als der erste vollständige Querschnitt der BCA gemessen ab der Aorta. Von dort an wurde die gesamte BCA konsekutiv aufgearbeitet und 12 Schnitte für die Volumenbestimmung der Läsion nach der obigen Formel herangezogen. Mittels dieser Auswertung konnten deutliche Veränderungen in der Progression der Atherosklerose unter FTY720 Fütterung beobachtet werden. In den FTY720 behandelten Tieren zeigte sich eine dramatische, geschlechts-unabhängige Reduktion des Läsionsvolumens, die 61,5% bei Männchen bzw. 45,7% bei Weibchen betrug (Abb. 12).

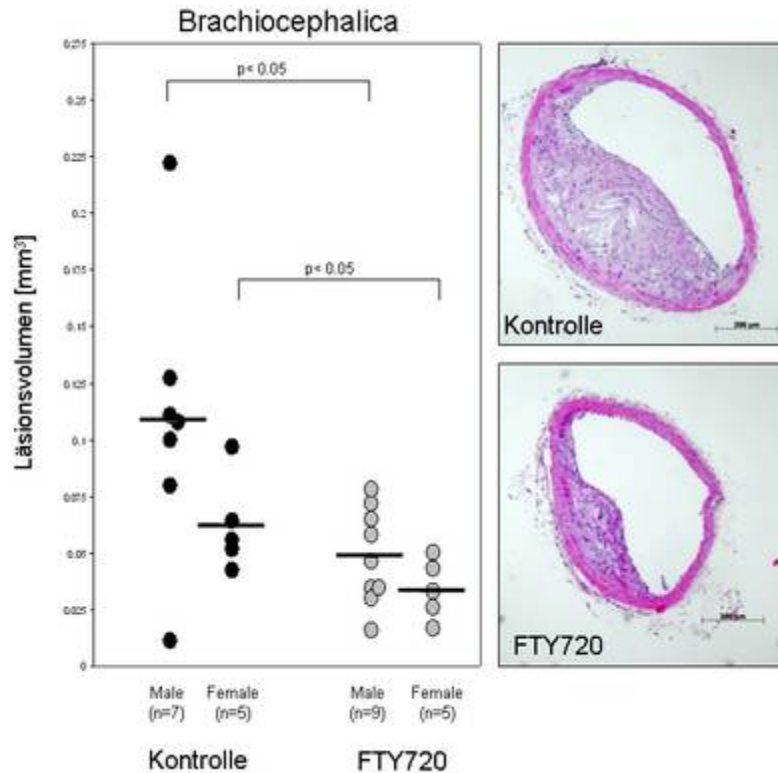


Abbildung 12: Fütterung mit FTY720 reduziert das Läsionsvolumen in der BCA bei ApoE^{-/-} Tieren.

ApoE^{-/-} Tiere wurden mit einer Western Diät gefüttert und eine Gruppe zusätzlich mit FTY720 behandelt. Die Auswertung des Läsionsvolumens nach 20 Wochen erfolgte nach der Formel von Cavalieri. Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen wurde das Läsionsvolumen durch FTY720 deutlich verringert.

Um die zelluläre Zusammensetzung der Läsionen zu untersuchen, wurden einzelne Schnitte (n=127 in der FTY720 behandelten und n=90 Schnitte in der unbehandelten Gruppe) für glatte Muskelzellen (SMC), Makrophagen, Lymphozyten sowie Kollagen und Elastin histologisch bzw. immunhistologisch gefärbt (Abb. 13). Die von den jeweiligen Zelltypen eingenommen Flächen wurden morphometrisch bestimmt und als Prozent von der Gesamtfläche der Läsion dargestellt. In dieser Auswertung zeigte sich eine Reduktion der Makrophagen um 41,8% in den Läsionen der FTY720-behandelten Tiere, während der Gehalt an SMC unverändert blieb (Abb. 14). Der Anteil von CD3+ Lymphozyten in den Läsionen war sehr gering und veränderte sich nicht unter Fütterung mit FTY720. Hingegen zeigte die Siriusrot-Färbung eine Verringerung des Kollagengehalts in den Läsionen der FTY720 behandelten Tiere um 63,5% (Abb. 14).

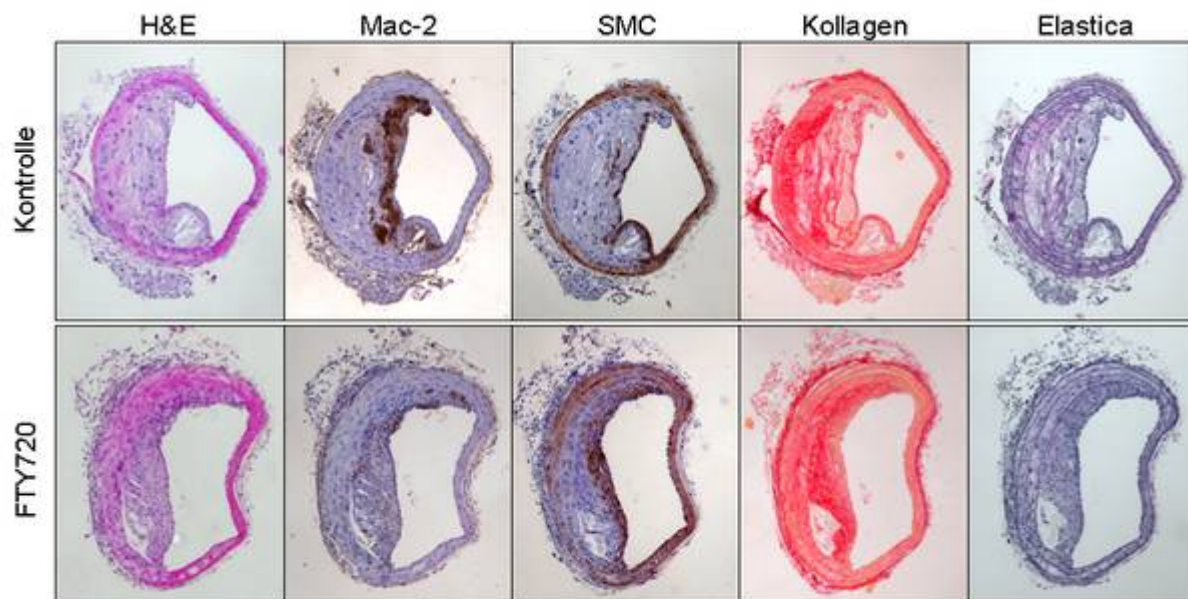


Abbildung 13: Die Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen wird durch die Fütterung mit FTY720 verändert.

Für die Bestimmung der Läsions-Komposition wurden konsekutive Schnitte für verschiedene Komponenten histologisch und immunhistologisch angefärbt. Die Fütterung mit FTY720 verringerte den Makrophagen-Anteil der Läsionen deutlich.

H&E: Hämalaun/Eosin, Mac-2: Makrophagen, SMC: glatte Muskelzellen

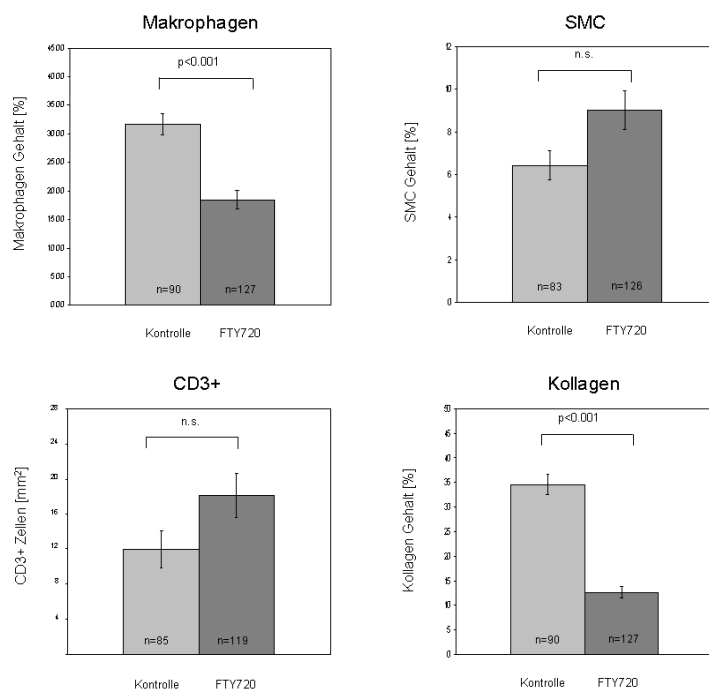


Abbildung 14: Quantitative Auswertung der Läsions-Komposition

Es wurden pro Gruppe zwischen 83 und 127 Schnitte für die jeweiligen Komponenten angefärbt, und anschließend als absolute Zellzahl oder prozentual zur Plaquefläche dargestellt. Der Makrophagen-Gehalt sowie der Kollagenanteil der Läsionen verringerte sich unter FTY720 Fütterung. Glatte Muskelzellen und CD3+ Lymphozyten waren nicht verändert.

Ähnliche Befunde bezüglich Läsionsgröße wurden auch an anderen anatomisch definierten Gefäßregionen wie der Aortenwurzel festgestellt, wo das Läsionsvolumen durch FTY720 um 46,3 % verringert wurde (Abb. 15).

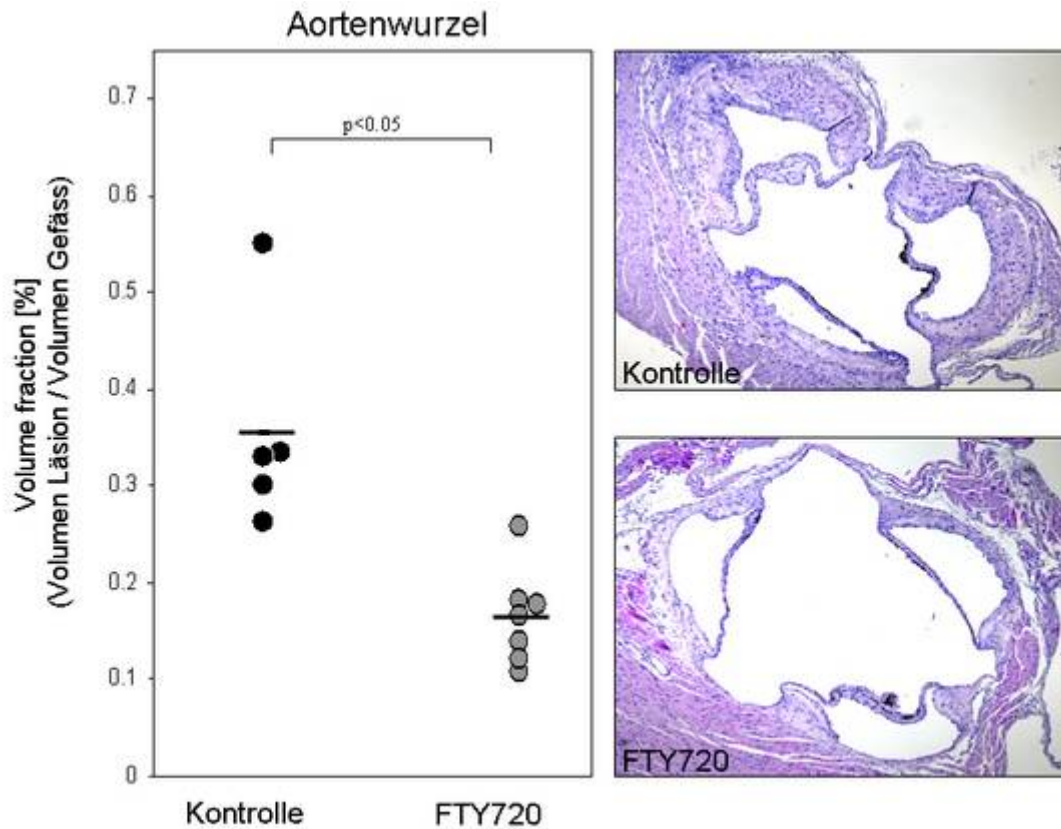


Abbildung 15: Fütterung mit FTY720 reduziert das Läsionsvolumen in der Aortenwurzel.

ApoE^{-/-} Tiere wurden 20 Wochen mit einer Western Diät gefüttert und eine Gruppe zusätzlich mit FTY720 behandelt. Die mit FTY720 behandelten ApoE^{-/-} Tiere zeigten kleinere Läsionen in der Aortenwurzel verglichen mit den unbehandelten Kontrollen.

Zusammengefasst führte die Behandlung von ApoE^{-/-} Mäusen mit FTY720 zu einer dramatischen Reduktion der Läsionsgröße, einem erniedrigten Anteil an Monozyten/Makrophagen und einem verringerten Kollagenanteil der Läsion.

Diese Ergebnisse wurden publiziert als:

Keul P, Tolle M, Lucke S, von Whuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. The Sphingosine-1-Phosphate Analogue FTY720 Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 607 - 613

3.2 Potentielle anti-atherogene Mechanismen von S1P und FTY720: Stimulation von eNOS und Inhibition von MCP-1

Um potentielle Mechanismen für die eindrucksvolle anti-atherogene Wirkung von FTY720 zu identifizieren, wurde die Wirkung von FTY720 auf die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und die Freisetzung atherogener Chemokine (MCP-1) untersucht. Beide Signalwege sind kausal an der Atherosklerose-Entstehung beteiligt.

3.2.1 FTY720 stimuliert die NO Produktion durch Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS)

Die Produktion von NO in der Gefäßwand zählt zu den wichtigsten anti-atherogenen Faktoren, während dessen Reduktion als einer der frühesten Indikatoren einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung bei Patienten gilt ¹²⁷. In tierexperimentellen Studien bewirkt eine begrenzte Bioverfügbarkeit von NO im Endothel eine beschleunigte Ansammlung von Monozyten/Makrophagen in der Gefäßwand, eine verschlechterte Vasodilatation als Antwort auf exogene Stimuli, und eine verstärkte Thrombusbildung ^{128, 129}. Mäuse, denen eine cholesterinreiche Diät verabreicht wird, zeigen eine Verschlechterung der Endothel-abhängigen Vasodilatation, die durch Gabe von L-Arginin, das als Substrat der eNOS zu NO umgesetzt wird, rückgängig gemacht werden kann ¹³⁰. Auch genetische Studien mit ApoE^{-/-}/eNOS^{-/-} Doppel-Knockout-Mäusen zeigen, dass das Fehlen von eNOS zu verstärkter Atherosklerose, Aneurysmenbildung und ischämischer Herzerkrankung führt ¹³¹.

Da S1P die Freisetzung von NO in Endothelzellen *in vitro* induzieren kann ¹⁰⁴, wurde in der vorgelegten Arbeit getestet, ob auch FTY720 diese Eigenschaft besitzt. Das biologisch aktive Metabolit von FTY720 ist FTY720-Phosphat (FTY720-P) ¹²², das *in vivo* durch Sphingosin-1-Phosphat Kinasen (SphK), genauer durch SphK-2 ¹³² nach Phosphorylierung aus FTY720 generiert wird. Aus diesem Grund wurde in der Arbeit nicht nur FTY720 (das möglicherweise *in vitro* inaktiv hätte sein können) sondern auch dessen aktive Form FTY720-P für die Untersuchung der Stimulierbarkeit der NO Produktion eingesetzt. Als zelluläres Testsystem wurden humane Endothelzellen aus der Nabenschnur (HUVEC) verwendet, deren NO Produktion nach Stimulation mit FTY720 mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Diaminofluorescein-2 Diacetate (DAF-2DA) gemessen wurde. DAF-2DA ist ein zellpermeabler, nicht fluoreszierender

Farbstoff, der durch Reaktion mit NO zum fluoreszierenden Triazol Derivat DAF-2T umgewandelt wird. Die Fluoreszenz von DAF-2T kann bei 515 nm spektrophotometrisch bzw. mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen werden und dient als Surrogat für NOS Aktivität¹³³. Mittels dieses Assays konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die NO Produktion in HUVEC sowohl durch FTY720 als auch FTY720-P stimuliert werden konnte (Abb. 16). Vorbehandlung der Zellen mit N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), einem Inhibitor der NO-Synthasen, konnte die durch FTY720-P ausgelöste NO Produktion komplett verhindern.

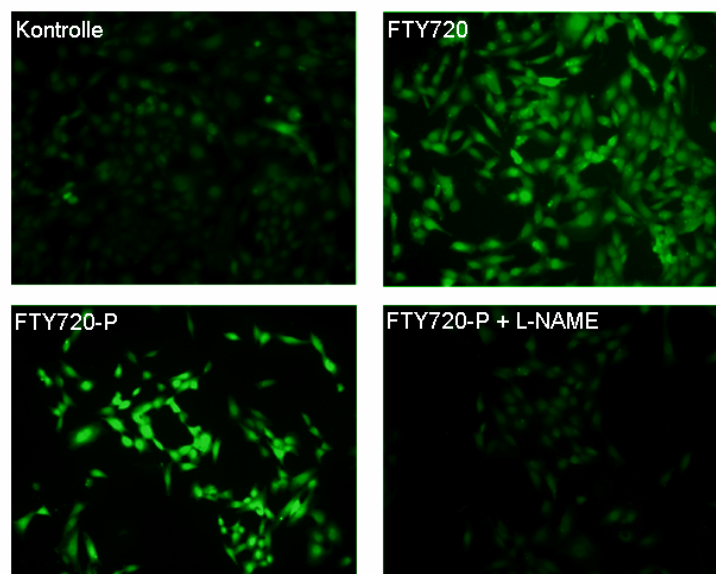


Abbildung 16: FTY720 und FTY720-P stimulieren die NO Produktion in humanen Endothelzellen.

HUVEC wurden mit DAF-2DA geladen und die NO-abhängige Fluoreszenz nach Stimulation mikroskopisch dargestellt. FTY720 und FTY720-P zeigten eine starke Stimulation der NO Produktion, die durch die Zugabe von L-NAME komplett inhibiert werden konnte.

Die prädominante NOS Isoform im Endothel ist die endotheliale NO Synthase (eNOS). Da S1P die Aktivität von eNOS durch eine Akt-vermittelte Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷ stimulieren kann²⁶, wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot untersucht, ob auch FTY720 bzw. FTY720-P diese Eigenschaften besitzen. In der Tat führte die Inkubation der Zellen mit FTY720 und FTY720-P zu einer dosis- und zeitabhängigen Akt Aktivierung (gemessen an der aktivierenden Ser⁴⁷³

Phosphorylierung), die mit einer eNOS Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷ einherging (Abb. 17). Der Einsatz von LY294002, einem selektiven Inhibitor der PI₃Kinase, konnte die Phosphorylierung von Akt und eNOS durch FTY720 und FTY720-P komplett aufheben, womit die Abhängigkeit der eNOS Aktivierung von Akt nachgewiesen wurde (Abb. 17)

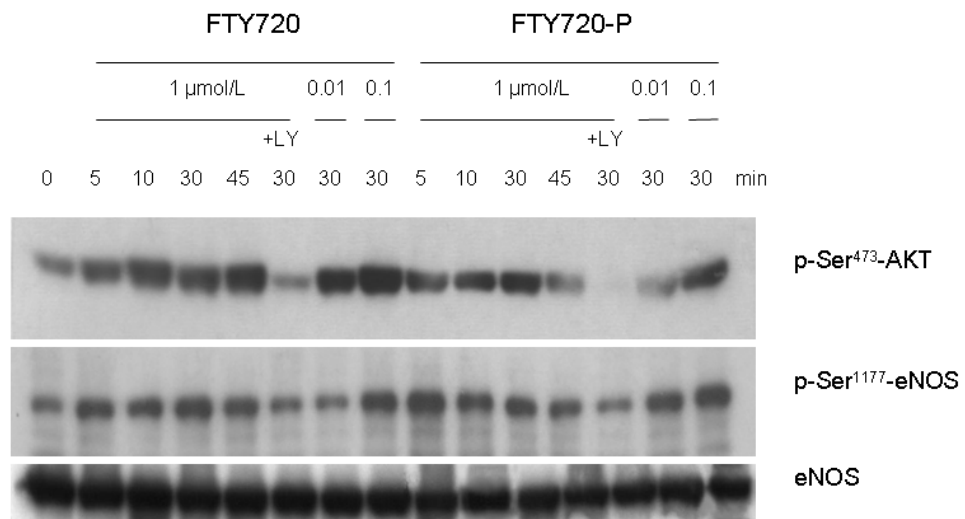


Abbildung 17: FTY720 und FTY720-P induzieren Akt- und eNOS-Phosphorylierung.

Die Inkubation von HUVEC mit FTY720 und FTY720-P führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Phosphorylierung von Akt und eNOS. Beide sind durch die Zugabe von LY294002 komplett inhibierbar.

Da die Experimente eine scheinbar gleiche Potenz beider Substanzen (FTY720 und dessen aktives Metabolit FTY720-P) zeigten, wurde ein Inhibitor der beiden Sphingosin-1-Phosphat Kinasen (SphK1 und SphK2), N,N-dimethyl-sphingosin (DMS), eingesetzt, der die Abhängigkeit des FTY720 Effekts von dessen endogener Phosphorylierung testen sollte. In der Tat verhinderte DMS die Phosphorylierung von Akt und eNOS durch FTY720, was den Schluss zuließ, dass eine Phosphorylierung von FTY720 durch endogene endotheliale SphK für die Stimulation von eNOS erforderlich ist. Diese Phosphorylierung scheint extrem schnell und effizient vonstatten zu gehen wie die Gruppe von Prof. van der Giet, Charite, Berlin, in Überständen von Aortenringen (Abb. 18) und HUVEC Zell-Lysaten mittels Massenspektrometrie nachweisen konnte: bereits nach zwei Minuten waren mehr als

70% des zugegebenen FTY720 zu FTY720-P umgewandelt. Diese Daten erklären die ähnliche Zeitkinetik der Aktivierung von eNOS durch beide Substanzen.

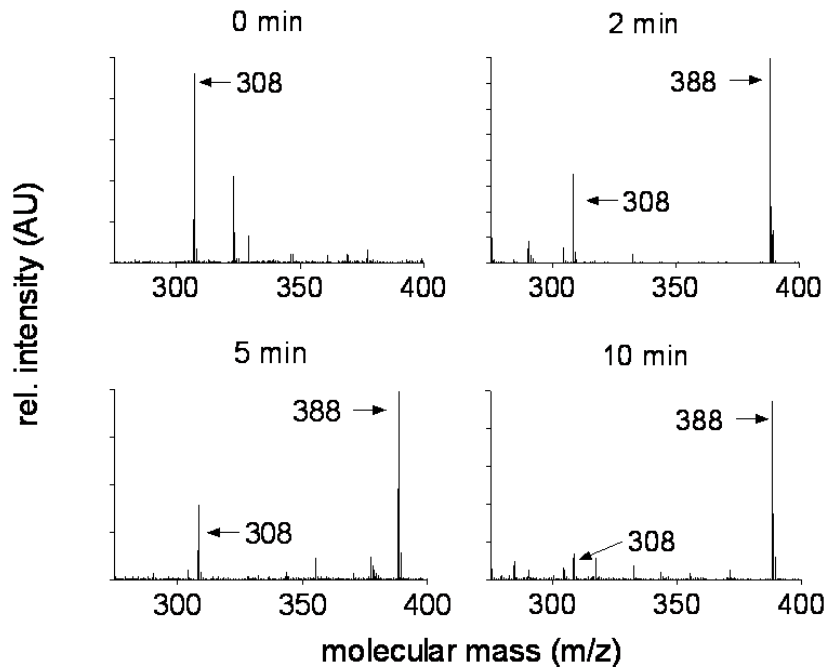


Abbildung 18: FTY720 durch Endothelzellen *in vitro* zu FTY720-P umgewandelt.

MALDI Massenspektrometrie der Überstände von Aortenringen aus der *A. thoracica* nach einer Inkubation mit FTY720 für verschiedene Zeiten (0, 2, 5, und 10 min). Das Signal bei 308 Da wird durch FTY720, das bei 388 Da durch FTY720-P verursacht. Bereits nach 2 min sind mehr als 70% des FTY720 zu FTY720-P umgewandelt (Abb. 5A, Tölle *et al.* 2005).

Die Verwendung von Stereoisomeren von FTY720 war der zweite Ansatz die Notwendigkeit der Phosphorylierung von FTY720 für dessen biologische Wirkung nachzuweisen, der gleichzeitig unspezifische Wirkungen von pharmakologischen Inhibitoren wie DMS vermeidet. Es wurden insgesamt 3 solcher Stereoisomere von FTY720 verwendet: 1) AAL151, ein chirales Analog von FTY720 (R-Konformation), das phosphoryliert werden kann; 2) AAL149, ein ebenfalls chirales Analog von FTY720 (S-Konformation), das allerdings nicht phosphoryliert werden kann, und 3) AFD 298, das die bereits phosphorylierte Form von AAL151 darstellt. Während AAL151 und AFD298 die Aktivierung von Akt und eNOS zeitabhängig induzierten, hatte das unphosphorylierbare Analog AAL149 keine Wirkung (Abb. 19). Damit

wurde der direkte Beweis geführt, dass eine Phosphorylierung von FTY720 zu FTY720-P für die Aktivierung von eNOS zwingend notwendig ist.

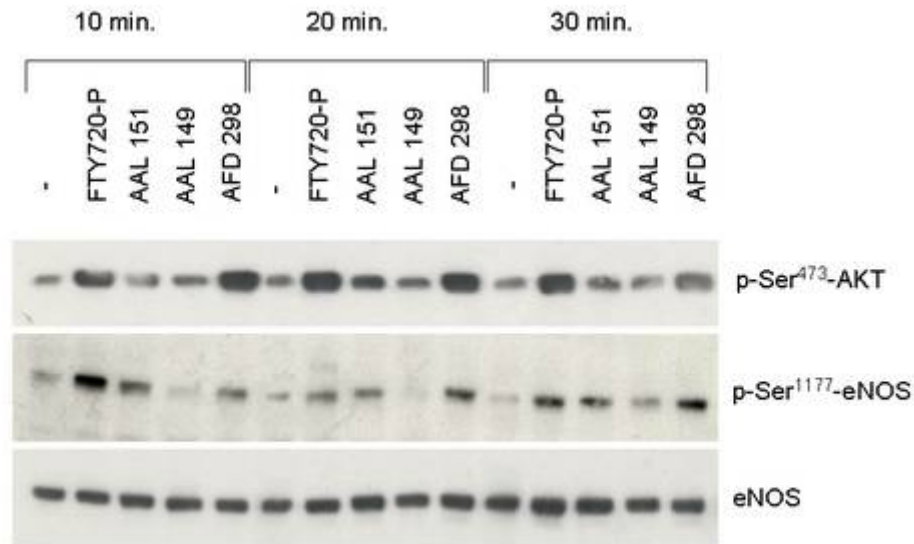


Abbildung 19: FTY720 muss phosphoryliert werden, um einen Effekt auf die Akt Aktivierung und eNOS Phosphorylierung zu haben.

HUVEC wurden mit FTY720-P sowie den 3 verschiedenen Analoga inkubiert und auf Akt- und eNOS Phosphorylierung getestet. Während FTY720-P, das Analog AAL 151 und die phosphorylierte Form von AAL 151 (AFD 298) in der Lage waren, Akt und eNOS zu phosphorylieren, war die unphosphorylierbare Form (AAL 149) inaktiv.

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden publiziert unter:

Tölle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, von Wnuck Lipinski K, Schönfelder G, Schäfers M, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, Giet M vd.

The immunosuppressant FTY720 induces eNOS-dependent arterial vasodilation via the lysophospholipid receptor S1P₃. *Circ Res.* 2005; 96: 913 - 920

3.2.2 FTY720 inhibiert die Produktion des pro-atherogenen Chemokins *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)*

Das Chemokin *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) ist ein etwa 13 kDa großes, monomeres Polypeptid der CC Chemokin Familie und wird deshalb auch als (C-C Motiv) Ligand 2 (CCL2) bezeichnet ¹³⁴. In der Gefäßwand sind verschiedene Zelltypen in der Lage MCP-1 zu produzieren, wie z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen. Die Emigration und Transmigration zirkulierender Monozyten in die entstehende atherosklerotische Läsion stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose dar. MCP-1 fördert diesen Vorgang maßgeblich ¹³⁴, was es zu einem der stärksten pro-atherogenen Chemokine macht. Den direkten Beweis dazu lieferten tierexperimentelle Studien in Knockout-Mäusen für MCP-1 ¹³⁵ bzw. dessen Rezeptor CCR-2 ¹³⁶, die in beiden Fällen eine deutlich verminderte Atherosklerose zeigen.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Verminderung der Atherosklerose unter Behandlung mit FTY720 zeigte, dass vor allem auch der Anteil an Makrophagen in der Läsion der behandelten Tiere vermindert war. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob FTY720 die Expression von MCP-1 beeinflussen kann. Dazu wurde Thrombin als Stimulus für die MCP-1 Produktion gewählt, da es MCP-1 sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene in glatten Muskelzellen induziert ¹³⁷. Für die hier beschriebenen Experimente wurden explantierte Aorten von C57Bl6 und S1P₃^{-/-} Mäusen im Organbad vom Endothel denudiert (um den alleinigen Effekt auf glatten Muskelzellen beobachten zu können), und anschließend mit Thrombin stimuliert. Das ins Medium abgegebene MCP-1 wurde mittels ELISA bestimmt. Stimulation der Aorten mit Thrombin für 24 Stunden führte in Wildtyp und S1P₃^{-/-} Mäusen gleichermaßen zu einer Sekretion von MCP-1. Bemerkenswerterweise inhibierte FTY720-P die MCP-1 Ausschüttung in Gefäßen aus C57Bl6 jedoch nicht in S1P₃^{-/-} Mäusen. Diese Ergebnisse zeigen, dass FTY720-P die MCP-1 Produktion in Aortenstücken der Maus hemmen kann, und dass dieser Effekt über den S1P₃-Rezeptor vermittelt wird (Abb. 20).

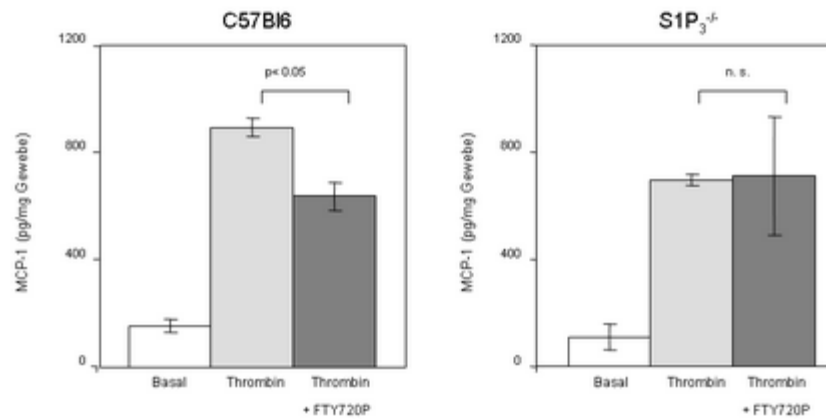


Abbildung 20: FTY720-P inhibiert die Thrombin-induzierte MCP-1 Produktion über den S1P₃ Rezeptor

Denudierte Aortenstücke von C57Bl6 und S1P₃^{-/-} Mäusen wurden allein, mit Thrombin (4U/ml) oder mit FTY720-P (0,1µM) und Thrombin inkubiert. Der MCP-1 Gehalt des Mediums wurde anschließend mittel ELISA bestimmt.

Weiterhin wurde getestet, ob FTY720-P die Transkription von MCP-1 hemmt. Dazu wurden kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte verwendet. Auch hier konnte, wie schon bei den Aortenstücken der Maus, gezeigt werden, dass FTY720-P die Thrombin-induzierte Stimulation von MCP-1 auf Proteinebene inhibieren kann. Nach Präparation von RNA und Real-Time PCR Analyse zeigte sich auch, dass FTY720-P die Expression der mRNA für MCP-1 konzentrationsabhängig inhibieren, und somit die Produktion von MCP-1 nach Stimulation mit Thrombin auf transkriptioneller Ebene hemmen konnte (Abb. 21).

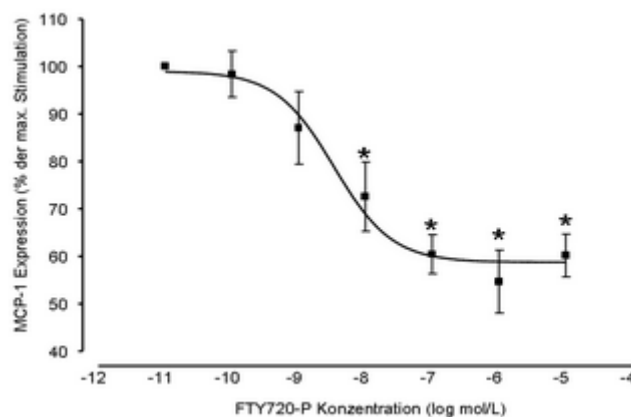


Abbildung 21: FTY720-P inhibiert die MCP-1 mRNA Expression in glatten Gefäßmuskelzellen.

Glatte Muskelzellen wurden mit 4U/ml Thrombin und verschiedenen Konzentrationen an FTY720-P für 4 h inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels Real-Time PCR analysiert. GAPDH wurde als endogenes Referenzgen benutzt (*, p<0,05).

Um die zugrunde liegenden Signaltransduktionswege der Inhibition von MCP-1 durch FTY720-P zu klären, wurde in einer gemeinsamen Studie mit der Arbeitsgruppe von Prof. van der Giet gezeigt, dass FTY720-P die MCP-1 Produktion über eine Inhibierung der Rac1 Untereinheit der NAD(P)H Oxidase hemmt²⁷. Rac-1 ist eine kleine GTPase, die neben wichtigen Funktionen in der Organisation des Zytoskeletts und Regulation der Zellmigration¹³⁸ auch einen wesentlichen Bestandteil der zellmembranständigen NAD(P)H Oxidase darstellt¹³⁹. Wir konnten zeigen, dass FTY720-P die Thrombin-induzierte, NAD(P)H Oxidase-abhängige Sauerstoffradikalproduktion hemmte, von der die MCP-1 Produktion abhängt. Diese Hemmung war, wie in *pull-down* Assays für aktives Rac1 mit Rhotekin-GST gezeigt wurde, auf die Inhibition von Rac1 zurückzuführen. Dieser Effekt wurde durch den S1P₃-Rezeptor vermittelt, da die Vorinkubation von glatten Muskelzellen mit FTY720-P (das als Agonist auf S1P₁ und S1P₃ benutzt wurde) jedoch nicht mit SEW2871 (ein S1P₁ Agonist) die MCP-1 Produktion hemmte, während die Hemmung durch VPC23019 (ein Antagonist für S1P₁ und S1P₃) und nicht durch JTE013 (ein Antagonist von S1P₂) aufgehoben werden konnte²⁷. Der endgültige Nachweis konnte in Gefäßen aus S1P₃ defizienten Tieren geführt werden, die keine Inhibition der NADPH Oxidase durch FTY720-P zeigten. Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit die inhibitorische Wirkung von FTY720-P auf die Produktion des inflammatorischen Chemokins MCP-1 charakterisiert und S1P₃ als der verantwortliche Rezeptor identifiziert.

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden publiziert unter:

Tölle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge U J, Levkau B, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, van der Giet M*, Nofer J-R.

HDL-associated lysophospholipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1542-8

3.3 S1P₃ Defizienz inhibiert die Rekrutierung inflammatorischer Makrophagen in die atherosklerotische Läsion und in das entzündlich veränderte Peritoneum

3.3.1 S1P₃ Defizienz verändert die Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen

Die bisherigen Ergebnisse der Arbeit identifizierten den S1P₃-Rezeptor als Vermittler von zwei potentiell anti-atherogenen Effekten von FTY720: die Stimulation der NO-Produktion und die Hemmung von MCP-1. Daher wurde im nächsten Schritt die Hypothese aufgestellt, dass sich eine Defizienz des S1P₃-Rezeptors auf die Progression der Atherosklerose auswirken würde. Um dies zu verfolgen, wurden S1P₃^{-/-} Mäuse für 8 Generationen auf den C57Bl6 Hintergrund rückgekreuzt und anschließend mit ApoE^{-/-} Mäusen gekreuzt. Mit den resultierenden ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Doppel-Knockout-Mäusen wurde anschließend die Studie durchgeführt. Für die Evaluation der Atherosklerose-Entwicklung wurden ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Mäuse verwendet, die 45 Wochen ein normales Haltungsfutter ohne Cholesterinzusatz erhalten hatten. Das Volumen der nativen atherosklerotischen Läsionen in der BCA wurde wie in Teil 1 der Arbeit bestimmt. Die Quantifizierung der Läsionsvolumina zeigte, dass es keinen Unterschied zwischen ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tieren gab (Abb. 22).

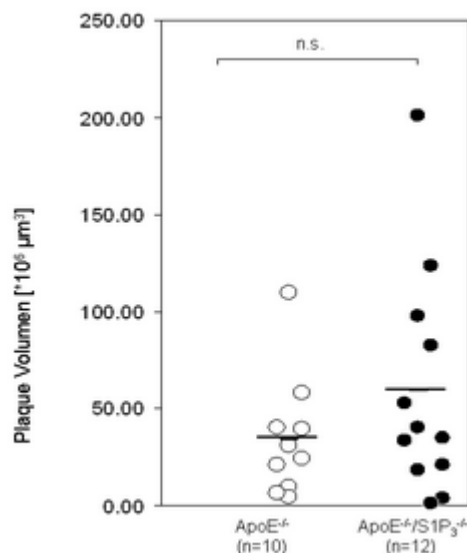


Abbildung 22: Das Läsionsvolumen von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Mäusen zeigt keine Unterschiede

Die Läsionsvolumina in der BCA von ApoE^{-/-} (n=10) und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Mäusen (n=12) nach 45 Wochen wurden nach der Cavalieri Methode bestimmt.

Ganz im Gegensatz dazu zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Läsionen. Der von Makrophagen eingenommene Anteil der Läsionen in ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Mäusen war um 76,1% im Vergleich zu ApoE^{-/-} reduziert (6,63% ± 1,05% versus 27,34% ± 2,65%). Ganz im Gegensatz dazu war der Gehalt an glatten Muskelzellen um 74,4% erhöht, (7,29% ± 0,95% versus 4,24% ± 0,60%) während die Menge an Kollagen unverändert blieb (Abb. 23). Die Analyse der Blutparameter und der Cholesterinwerte im Plasma zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 4). Diese Ergebnisse weisen auf eine Veränderung der Läsionsmorphologie zu einer stabileren und weniger entzündlichen Läsion hin.

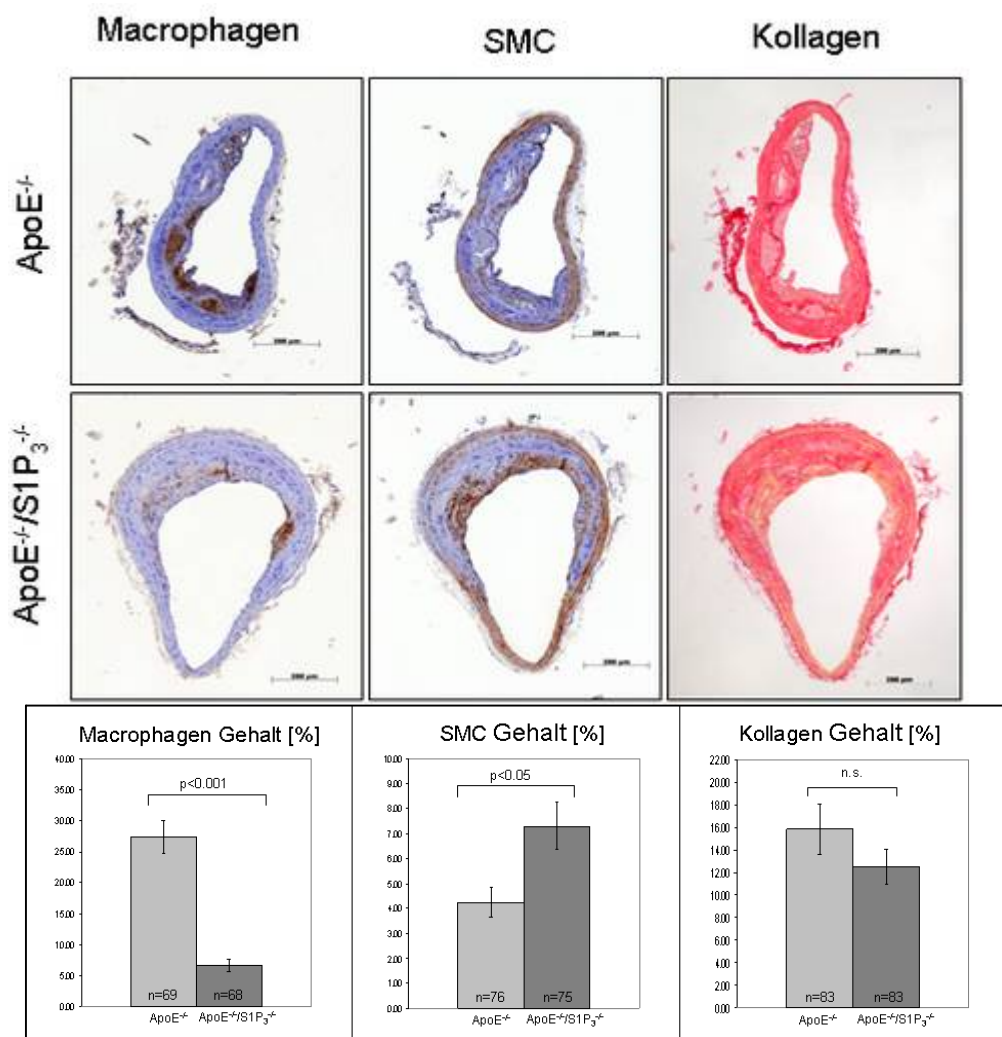


Abbildung 23: Veränderte Zusammensetzung der nativen atherosklerotischen Läsionen in ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tieren

ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tiere wurden 45 Wochen mit Haltungsfutter gefüttert. Makrophagen und glatte Muskelzellen in der BCA wurden immunhistologisch nachgewiesen, Kollagen mittels einer Siriusrot-Färbung. Gezeigt sind repräsentative Bilder der Färbungen (oben) und deren quantitative Auswertung (unten).

Tabelle 4: Blutparameter von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tieren

Blutwerte und Plasmalipidspiegel wurden aus retroorbital entnommenem Blut bestimmt.

Parameter	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} /S1P ₃ ^{-/-}	
RBC [10 ⁶ /ml]	11086 ± 228.2	11955 ± 715.56	n.s.
WBC [10 ⁶ /ml]	6.51 ± 0.58	6.87 ± 0.79	n.s.
Lymphozyten [10 ⁶ /ml]	5.03 ± 0.47	4.9 ± 0.63	n.s.
Monozyten [10 ⁶ /ml]	0.26 ± 0.02	0.31 ± 0.05	n.s.
Granulozyten [10 ⁶ /ml]	1.22 ± 0.11	1.65 ± 0.21	n.s.
Plättchen [10 ⁶ /ml]	1146 ± 45.22	1110 ± 125.13	n.s.
Cholesterin [mg/dl]	161.26 ± 9.19	194.08 ± 18.89	n.s.

3.3.2 S1P₃^{-/-} Makrophagen haben einen Defekt in der Rekrutierung bei Peritonitis

Monozyten sind die ersten Zellen, die sich am aktivierten Endothel der beginnenden atherosklerotischen Läsion anheften, in die Gefäßwand einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren. Die Rekrutierung zum entzündlich veränderten Endothel wird durch die endotheliale und glattmuskuläre Sekretion von Chemokinen wie MCP-1 verursacht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der nativen Atherosklerose ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Mäuse deutlich weniger Makrophagen in der Läsion haben als ApoE^{-/-} Kontrolltiere. Die Ursache dafür könnte eine fehlerhafte Rekrutierung der Makrophagen zum geschädigten Endothel sein. Um diese Hypothese zu testen wurde ein klassisches Modell für die Untersuchung von Makrophagenrekrutierung angewendet – die akute, durch intraperitoneale Injektion des sterilen Irritans Thioglykollat induzierte Peritonitis¹⁴⁰. Dazu wurde S1P₃^{-/-} und C57Bl6 Mäusen Thioglykollat injiziert und die Anzahl der ins Peritoneum eingewanderten Makrophagen nach 96 h bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der ins Peritoneum rekrutierten Makrophagen in S1P₃^{-/-} Mäusen um ~50% im Vergleich zu C57Bl6 vermindert war (Abb. 24)

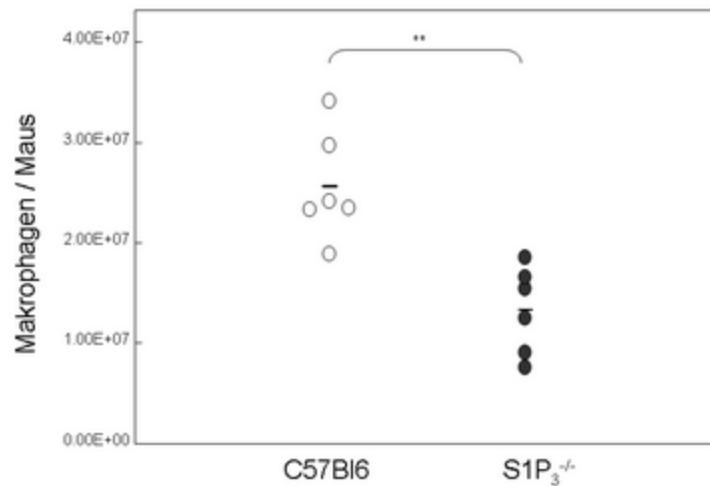


Abbildung 24: Verminderte Rekrutierung von Makrophagen ins Peritoneum bei S1P₃^{-/-} Tieren.

Peritoneal-Makrophagen wurden 96 h nach Thioglykollat-Injektion gewonnen und die Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt (**, p<0,01).

Ob der Rekrutierungsdefekt der Makrophagen auf eine verminderte Migration aufgrund ihres fehlenden S1P₃-Rezeptors zurückzuführen ist, wurde in der Boyden Kammer mittels isolierter Peritoneal-Makrophagen aus C57Bl6 und S1P₃^{-/-} Mäusen getestet. Als chemotaktischer Stimulus wurde S1P verwendet. Während die Makrophagen von C57Bl6 Tieren eine deutliche Migration zu S1P nach 4 h zeigten, migrierten die Makrophagen aus S1P₃^{-/-} Tieren nicht (Abb. 25).

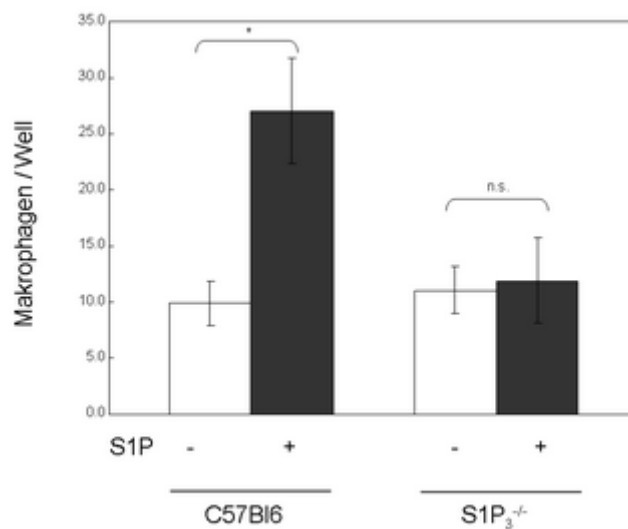


Abbildung 25: S1P₃^{-/-} Makrophagen migrieren nicht zum chemotaktischen Stimulus S1P

Peritoneal-Makrophagen aus C57Bl6 und S1P₃^{-/-} Mäusen wurden 96h nach Thioglykollat-Injektion entnommen und in der Boyden Kammer auf Migration zu 1 µM S1P getestet (*, p<0,05).

Wenn die verminderte Rekrutierung von $S1P_3^{-/-}$ Makrophagen ins Peritoneum auf deren *in vitro* nachgewiesene gestörte Migration zu S1P zurückzuführen wäre, so hätte im Peritoneal-Exsudat S1P als migratorischer Stimulus vorhanden sein müssen. In der Tat konnte ein zeitlicher Anstieg von S1P im Peritoneum mit einem Konzentrationsmaximum 24 h nach Thioglykollat-Injektion mittels HPLC nachgewiesen werden (Messung durch M. Gräler, MHH Hannover, Abb. 26). Die Elimination der Wirksamkeit dieses S1P-Gradienten mittels einer sechswöchigen Vorbehandlung der Tiere mit FTY720 inhibierte auch die Rekrutierung von Makrophagen (Abb. 27).

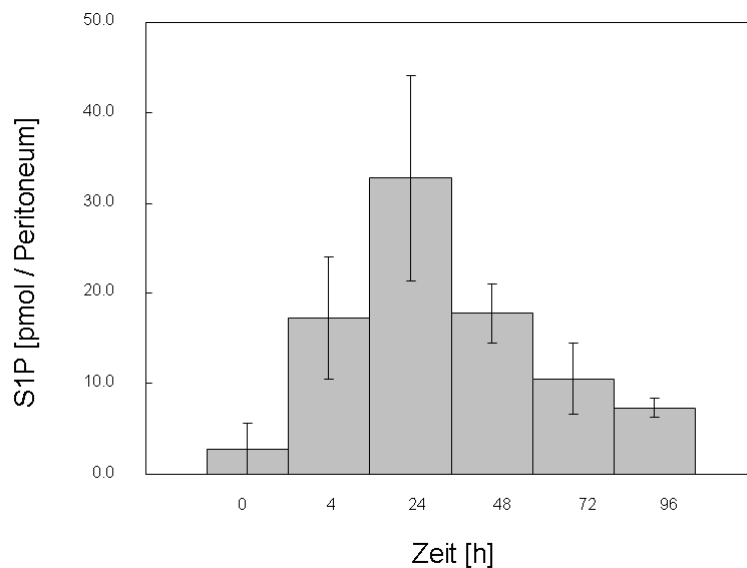


Abbildung 26: Anstieg von S1P im Peritoneal-Exsudat bei Thioglykollat-induzierter Peritonitis

Das Exsudat wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Thioglykollat-Injektion (0, 4, 24, 48, 72, 96h) entnommen und mittels HPLC auf die Konzentration von S1P hin untersucht (bestimmt durch Dr. M. Gräler, MHH). Es konnte ein Konzentrationsmaximum 24 h nach Thioglykollat-Injektion identifiziert werden.

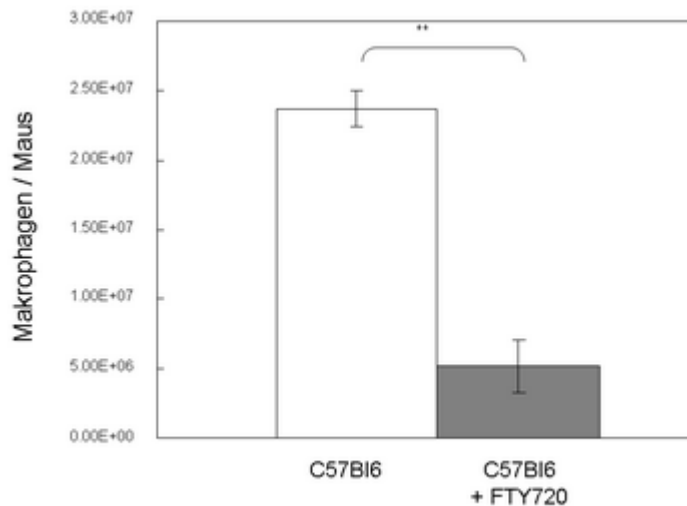


Abbildung 27: Vorbehandlung mit FTY720 inhibiert die Rekrutierung von Makrophagen ins Peritoneum

Die Behandlung der Tiere mit FTY720 (1,25mg/kg/Tag mit dem Trinkwasser) 6 Wochen vor der Thioglykollat-Injektion führte zu einer reduzierten Makrophagen-Rekrutierung ins Peritoneum. (**, $p < 0,05$)

Zusammenfassend scheint der beobachtete *in vivo* Rekrutierungsdefekt der Peritoneal-Makrophagen von $S1P_3^{-/-}$ Tieren in deren fehlerhafter Migration in Richtung eines pro-inflammatorisch wirksamen $S1P$ -Gradienten im Peritoneal-Exsudat zu liegen.

3.3.3 Das Fehlen des $S1P_3$ -Rezeptors in hämatopoetischen Zellen beeinträchtigt die Rekrutierung von Makrophagen in die atherosklerotische Läsion: Studien in hämatopoetischen Chimären

Da die Defizienz von $S1P_3$ bei der Atherosklerose-Entwicklung zu einem geringeren Makrophagengehalt in der Läsion *in vivo* führte und das Fehlen von $S1P_3$ auf Makrophagen deren Migration zu $S1P$ *in vitro* beeinträchtigte, stellte sich die Frage, ob die Veränderungen bei der Atherosklerose aufgrund des Fehlens von $S1P_3$ auf Monozyten/Makrophagen oder dem Endothel verursacht werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Knochenmarks-Chimären hergestellt. Dazu wurden $ApoE^{-/-}$ und $ApoE^{-/-}/S1P_3^{-/-}$ Mäuse mit 11 Gray subletal irradiert und einer Knochenmarks-

Transplantation unterzogen, bei der ApoE^{-/-} Tieren das Knochenmark von ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tieren transplantiert wurde und *vice versa*. In diesem Modell haben alle hämatopoetischen Zellen inklusive Monozyten/Makrophagen der mit S1P₃-defizientem Knochenmark transplantierten ApoE^{-/-} Tiere keinen S1P₃, während das Endothel normale S1P₃ Expression aufweist. Im umgekehrten Fall haben die Monozyten/Makrophagen der mit ApoE-defizientem Knochenmark transplantierten ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tiere eine normale S1P₃ Expression, während deren Endothel kein S1P₃^{-/-} hat. Die so hergestellten Knochenmarks-Chimären wurden für 12 Wochen mit einer Western-Type-Diät gefüttert, um die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen zu fördern. Danach wurde Läsionsgröße und Makrophagengehalt in der Aortenwurzel bestimmt. Der Erfolg der Knochenmarks-Transplantation wurde anhand einer PCR für S1P₃ aus Leukozyten des peripheren Blutes eines jeden Tieres nachgewiesen (Abb. 28).

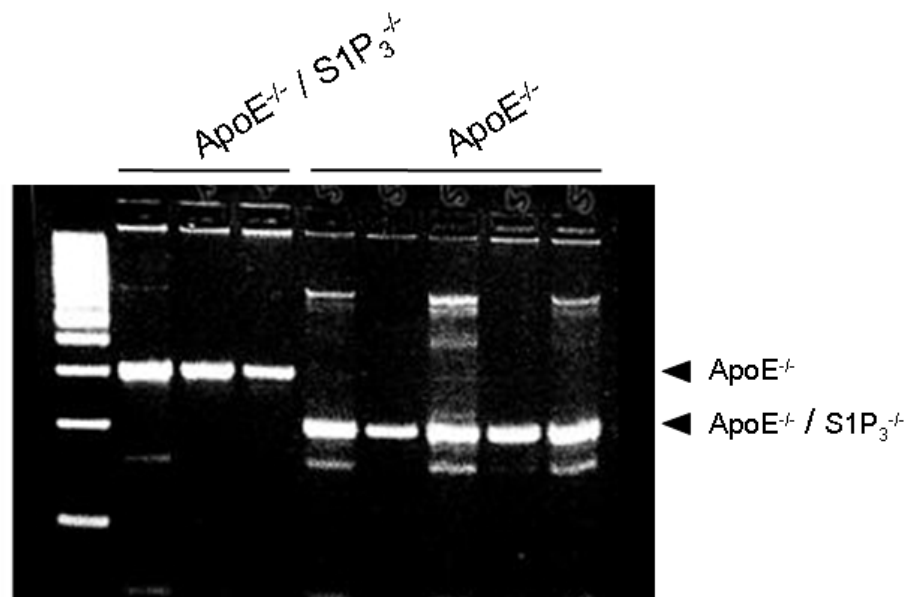


Abbildung 28: Nachweis der erfolgreichen Knochenmarks-Transplantation bei der Herstellung hämatopoetischer Chimeren

Diagnostische PCR für das Vorhandensein bzw. Fehlen von S1P₃^{-/-} aus dem Blut von hämatopoetischen Chimeren (ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-}). Oben angegeben ist der ursprüngliche Genotyp und rechts der Genotyp der hämatopoetischen Zellen 12 Wochen nach der Transplantation. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von 3 bzw. 5 Tieren der jeweils 12 Tiere umfassenden Gruppen.

Während die Läsionsgröße unverändert blieb, zeigte die quantitative Auswertung des Makrophagenanteils einen niedrigeren prozentualen Anteil in Läsionen von ApoE^{-/-} Tieren, die ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Knochenmark erhalten hatten, verglichen mit ApoE^{-/-}/S1P₃^{-/-} Tieren, die ApoE^{-/-} Knochenmark erhalten hatten (Abb. 29). Dieser Befund bestätigte die Notwendigkeit des S1P₃-Rezeptors auf Makrophagen für deren Rekrutierung in die atherosklerotische Läsion.

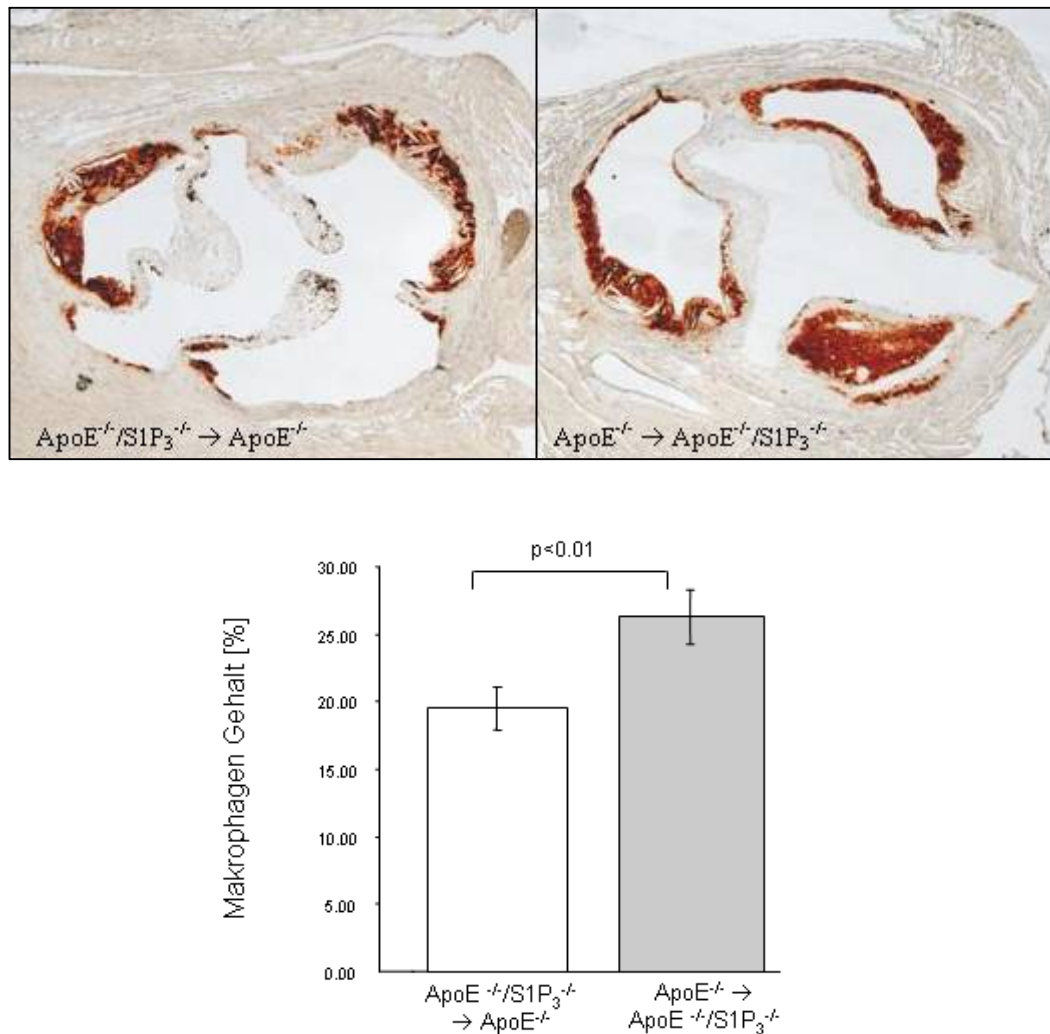


Abbildung 29: Der S1P₃-Rezeptor auf hämatopoetischen Zellen ist erforderlich für die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen in die atherosklerotische Läsion.

Der Makrophagengehalt der atherosklerotischen Läsionen in den Aortenwurzeln der zwei hämatopoetischen Chimären wurde nach 12 Wochen Fütterung mit Western-Type-Diet quantitativ bestimmt. Oben: repräsentative Immunhistologie für Makrophagen für jede der Chimären; Unten: quantitative Auswertung des Makrophagengehalts der Läsionen.

4 Diskussion

In allen Stadien der Atherosklerose, angefangen bei der Adhäsion von Monozyten ans aktivierte Endothel bis zur Ruptur und Atherothrombose der komplexen Läsion, spielen entzündliche Vorgänge und deren Mediatoren eine entscheidende Rolle ¹⁴¹. Während in den letzten Jahren vor allem die herausragende Bedeutung von Adhäsionsmolekülen, Integrinen, und Chemokinen bei der Progression der Atherosklerose identifiziert wurde, rücken mittlerweile zunehmend Fragen über die Rolle bioaktiver Lipide in den Fokus der molekularen Atheroskleroseforschung. Von besonderem Interesse sind dabei die Sphingolipide und vor allem S1P mit dessen erst kürzlich charakterisierten fundamentalen Rollen bei Immunantwort, Entzündung und in der Herz-Kreislauf-Physiologie. S1P wird einerseits von vielen der an der Atherosklerose beteiligten Zelltypen wie Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und SMC produziert, andererseits entfaltet es selbst mannigfaltige biologische Wirkungen auf all diese Zelltypen. Gleichzeitig ist S1P in physiologisch wirksamen Konzentrationen im Plasma vorhanden, wo es bis zu 70% in der HDL-Fraktion enthalten ist. Dieses in HDL-enthaltene S1P wird für viele der HDL zugeschriebenen Effekte verantwortlich gemacht.

Nichtsdestotrotz ist bislang die für die Atheroskleroseforschung in Bezug auf S1P wichtigste Frage – ob S1P *in vivo* pro- oder anti-atherogen wirkt – unbeantwortet geblieben. Die hier vorgelegte Arbeit beleuchtet mehrere Aspekte dieser Frage. Im ersten Teil wurde gezeigt, dass das stabile, oral bioverfügbare S1P-Analog FTY720 die netto Entwicklung der Atherosklerose hemmt. Daraus lassen sich Rückschlüsse über die Wirkung des natürlichen Substrats S1P ziehen, ohne allerdings das Augenmerk für die Unterschiede zwischen den beiden Substanzen zu verlieren, auf die in der Diskussion eingegangen wird. Im zweiten Teil der Arbeit wurden potentielle Mechanismen der atheroprotektiven Rolle von FTY720, wie dessen Stimulation der Stickstoffmonoxidsynthese und Inhibition der Produktion von Chemokinen beleuchtet. Im dritten Teil wurde die Rolle eines S1P-Rezeptors, S1P₃, in der Atherogenese und im akuten Modell der Peritonealentzündung untersucht.

FTY720 und S1P als potentiell atheroprotektive Substanzen

S1P und FTY720 haben eine Reihe von ähnlichen Wirkungen, die allesamt auf verschiedene Mechanismen der Atherosklerose-Entstehung eine Auswirkung haben könnten. Ein wichtiger Effekt beider Substanzen, der mit der Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques zusammenhängen könnte, ist ihre Verminderung der endothelialen Permeabilität unter entzündlichen Bedingungen^{8, 48}, was eine verminderte Diapedese von Entzündungszellen in der Atherosklerose nach sich ziehen könnte. Auch die Adhäsion von Monozyten an das aktivierte Endothel kann durch S1P und FTY720 minimiert werden, wofür deren mannigfaltige Effekte auf Adhäsionsmoleküle und Chemokine verantwortlich gemacht werden¹⁴². Da S1P die Produktion von NO durch eNOS induzieren kann, und NO einen atheroprotektiven Faktor darstellt (u.a. durch die Präservierung endothelialer Integrität, Verminderung der Endotheldurchlässigkeit und Inhibition der Monozyten/Makrophagen-Adhäsion), könnten S1P und FTY720 über diesen Mechanismus zur Atheroprotektion beitragen. In der hier vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass FTY720 sowohl die NO Produktion als auch die aktivierende Phosphorylierung von eNOS stimulieren konnte. Dazu war die Phosphorylierung von FTY720 zu dessen wirksamen Metabolit FTY720-P notwendig, die schnell und effizient durch DMS-inhibierbare S1P-Kinasen bewirkt wurde. Diese *in vitro* Studien implizieren NO als ein mögliches Wirkprinzip in der anti-atherosklerotischen Wirkung von FTY720. Um das *in vivo* kausal beweisen zu können, müsste die atheroprotektive Wirkung von FTY720 in Anwesenheit eines NO-Inhibitors wie L-NAME oder in eNOS-defizienten Mäusen überprüft werden.

Der zweite Mechanismus, der für die Atheroprotektion durch FTY720 verantwortlich sein könnte, ist dessen Inhibition der MCP-1 Produktion. Das atherogene Chemokin MCP-1 spielt eine kritische Rolle bei der Monozyten/Makrophagen Rekrutierung hin zu atherosklerotischen Läsionen, es verstärkt die Bildung von Sauerstoffradikalen und induziert die Expression von pro-inflammatorischen Genen in Monozyten¹³⁴. Die atherogene Wirkung von MCP-1 und dessen Rezeptor CCR-2 wurde vor rund 10 Jahren nachgewiesen, als gezeigt werden konnte, dass der systemische Knockout von MCP-1 oder CCR-2 zu reduzierter Atherosklerose und verminderter Makrophagen-Akkumulation in atherosklerotischen Läsionen führte^{136, 143}. Neben der Inhibition von MCP-1 könnten FTY720 und S1P auch durch direkte Effekte die

Adhäsion von Monozyten/Makrophagen und ihre Rekrutierung zu atherogen verändertem Endothel hemmen. Von S1P wurde z.B. gezeigt, dass es die Adhäsion von Monozyten an TNFa-aktiviertes Endothel der Aorta inhibiert ¹⁴⁴. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass S1P sowohl die Makrophagen-Adhäsion an TNFa-aktivierte Endothelzellen in der Flusskammer *in vitro*, als auch die Leukozyten-Extravasation während der post-ischämischen Inflammation bei Ischemie/Reperfusion des Herzens *in vivo* inhibiert ⁶⁷. Dieser Prozess kann wiederum von der Aktivierung monozytärer Integrine durch MCP-1 abhängen ¹⁴⁵. Als Inhibitor der MCP-1-Produktion könnte FTY720 ebenso wie S1P die Adhäsion und Rekrutierung der Monozyten in die atherosklerotische Läsion hemmen und so vor Atherosklerose schützen. Trotz der in dieser Arbeit festgestellten inhibitorischen Wirkung von FTY720 auf die MCP-1 Produktion in SMC *in vitro* konnte kein Unterschied im MCP-1-Gehalt der Läsionen zwischen FTY720-behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass fortgeschrittene Läsionen untersucht wurden, in denen MCP-1 vorwiegend von Makrophagen und nicht von SMC gebildet wird. Weiterhin wird MCP-1 vor allem während der ersten 4 Wochen in der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen bei ApoE^{-/-} Mäusen hochreguliert und sinkt mit der Zeit ab ¹⁴⁶, während die in der Arbeit untersuchten Läsionen von 12 Wochen-alten Tieren stammten. Damit könnten das fortgeschrittene Alter der untersuchten Läsionen und deren zelluläre Zusammensetzung vorausgegangene Effekte von FTY720 auf die MCP-1 Expression verschleiert haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FTY720 über mindestens zwei Mechanismen die Atherosklerose inhibieren könnte: durch Stickstoffmonoxid-vermittelte Verminderung der Endotheldurchlässigkeit, Monozyten/Makrophagen-Adhäsion, und durch Inhibition des für Monozyten/Makrophagen-Rekrutierung wichtigen Chemokins MCP-1. Auch andere Mechanismen der Atheroprotektion durch FTY720 sind denkbar: die immunsuppressive Wirkung von FTY720 könnte ein solcher sein, da die Atherosklerose ein Prozess ist, bei dem sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem eine entscheidende Rolle spielen ¹⁴⁷. Die durch FTY720 hervorgerufene Immunsuppression könnte auch zur Inhibition der Atherosklerose beitragen, wie es für andere Immunsuppressiva wie Rapamycin (Sirolimus) bereits gezeigt worden ist ¹⁴⁷.

Obwohl die erläuterten Mechanismen durch S1P und FTY720 gleichermaßen ausgelöst werden können, gibt es zwischen den beiden Substanzen auch entscheidende Unterschiede: FTY720 wirkt als Agonist lediglich auf vier der fünf S1P-Rezeptoren, mit S1P₂ als einziger Ausnahme. Zusätzlich wirkt es im Gegensatz zu S1P als funktioneller Antagonist auf S1P₁, indem es zur Rezeptor-Internalisierung und proteosomaler Degradation führt, während der Effekt von S1P auf S1P₁ lediglich zur transienten Internalisierung ohne Degradation und anschließendem Wiedererscheinen auf der Zelloberfläche führt¹⁴⁸. Damit lässt sich die Desensitisierung von S1P₁ durch FTY720 nach einer initialen Stimulation erklären. Die dargestellten Unterschiede zwischen S1P und FTY720 sollten daher berücksichtigt werden, wenn von der Wirkung des S1P-Agonisten FTY720 auf die des endogenen Moleküls S1P geschlossen wird.

Die Funktion von S1P₃ in der Atherosklerose: Makrophagen versus Endothel

Obwohl sich mehrere mutmaßlich Rezeptor-spezifische Substanzen in der Entwicklung bei der Pharmaindustrie befinden, gab es bei der Anfertigung dieser Arbeit keine Rezeptor-spezifischen Agonisten oder Antagonisten, die sich für Langzeitstudien geeignet hätten. Um die Wirkung einzelner Rezeptoren, insbesondere S1P₃, auf die Atherosklerose zu untersuchen wurde daher die S1P₃ Knockout-Maus als alternativer Zugang gewählt. Dieser Ansatz hat mehrere Vorteile: 1) Das System wird nicht mit einem Überschuss an exogenem, pharmakologischen Liganden überladen, sondern bleibt der Wirkung und Konzentration des natürlichen Liganden S1P ausgesetzt; 2) es wird selektiv die Rolle eines einzelnen Rezeptors untersucht, und 3) durch die Verwendung von Knochenmarks-Chimären kann die Rolle von S1P₃ in hämatopoetischen Zellen getrennt von der in Zellen der Gefäßwand untersucht werden. Durch die Generierung eines Atherosklerose-anfälligen, S1P₃-defizienten Mausstammes nach Rückkreuzung mit ApoE^{-/-} bestand die Möglichkeit die Atherosklerose-Entwicklung zunächst unter dem Aspekt des globalen Fehlens von S1P₃ zu untersuchen. Obwohl der globale Knockout des S1P₃-Rezeptors keinen Einfluss auf die Läsionsgröße hatte, veränderte er die Läsionszusammensetzung im Vergleich zu ApoE^{-/-} dramatisch. Immunhistologische Färbungen zeigten eine deutliche Reduktion an Makrophagen und eine nicht weniger deutliche Zunahme an SMC in der Läsion, was beides Kriterien für die Ausbildung

einer „stabileren“, weniger Ruptur-gefährdeten Läsion sind. Da besonders Makrophagen für die Destabilisierung einer Läsion verantwortlich gemacht werden^{89, 149}, wurde als nächstes der Mechanismus der drastischen Reduktion des Makrophagen-Gehalts der Läsion untersucht. Dabei könnten Veränderungen in der Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen eine entscheidende Rolle spielen. Da bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen sowohl das Endothel als auch der Leukozyt maßgeblich beteiligt sind, wurden – um die Rolle von S1P₃ in beiden Zelltypen getrennt voneinander zu untersuchen – Knochenmarks-Chimären hergestellt. Der in Läsionen von hämatopoetischen S1P₃^{-/-} Chimeren reduzierte Makrophagen-Gehalt von Läsionen lässt darauf schließen, dass der S1P₃-Rezeptor auf Monozyten/Makrophagen für die Rekrutierung in die atherosklerotische Läsion notwendig ist. Die Rolle von S1P₃ in der Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen wurde auch im Modell der akuten, Thioglykollat-induzierten peritonealen Entzündung bestätigt, bei der S1P₃-defiziente Tiere eine Verringerung der Makrophagen-Rekrutierung ins Peritoneum zeigten. Dabei scheint S1P selbst ein direktes „chemoattractant“ für Monozyten/Makrophagen zu sein, wie in dieser Arbeit mittels Boyden Kammer Experimenten *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Die promigatorische Wirkung von S1P *in vitro* scheint über den Makrophagen-ständigen S1P₃-Rezeptor mediiert zu werden, da Peritoneal-Makrophagen aus S1P₃-defizienten Tieren einen Migrationsdefekt zu S1P zeigten. Auch *in vivo* könnte S1P ein „chemoattractant“ sein, da: 1) die im Peritoneal-Exsudat gemessenen Erhöhungen der S1P-Spiegel zeitlich und quantitativ eng mit der Kinetik der Makrophagen-Rekrutierung korreliert sind, und 2) die Elimination des funktionsfähigen S1P-Gradienten durch Vorbehandlung mit FTY720 die Makrophagen-Rekrutierung ins Peritoneum verhinderte. Ob der S1P-Gehalt atherosklerotischer Läsionen erhöht ist und damit der Makrophagen-Rekrutierung bei Atherosklerose Vorschub leistet, muss noch untersucht werden, aber zwei Befunde sprechen dafür: 1) die Sphingosinkinase-1 als S1P-produzierendes Enzym ist in der Läsion stark exprimiert und dort mit Makrophagen ko-lokalisiert (eigene unveröffentlichte Daten), und 2) Lysophosphatidylsäure (LPA), ein dem S1P verwandtes Lysophospholipid, wurde in hohen Mengen in menschlichen Plaques gefunden¹¹⁵.

Obwohl die hier vorgelegte Arbeit klar zeigt, dass der Monozyten/Makrophagen-ständige S1P₃ die Rekrutierung dieser Zellen zum Ort der Entzündung reguliert,

weisen vor allem die *in vivo* Daten daraufhin, dass dies nicht der alleinige Mechanismus ist, sondern dem Endothel-ständigen S1P₃ auch eine Rolle zukommt. Ein klares Argument dafür ist der Befund, dass der Makrophagen-Gehalt der Läsionen in den S1P₃-Chimären um ~20-30% reduziert war, während er in der globalen S1P₃ Knockout-Maus um ~70% verringert war. Daraus ließe sich schließen, dass S1P₃ im Endothel auch eine Rolle, und zwar eine pro-adhäsive, spielt. Damit stünde die Funktion von S1P₃ im Endothel im Gegensatz zu der von S1P₁, dem anti-adhäsive Effekte auf Entzündungszellen zugeschrieben werden^{144, 150}. Mechanistischen Aufschluss über das Zusammenwirken dieser beiden S1P-Rezeptoren bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen würden z.B. intravital-mikroskopische Untersuchungen in Entzündungsmodellen liefern, bei denen Leukozyten-Rolling und -Adhäsion in S1P₃^{-/-} und Wildtyp-Tieren verglichen werden bzw. in S1P₃-Knochenmarks-Chimären mit und ohne S1P-Rezeptor Inhibitoren. Genetische Evidenz würden Untersuchungen in induzierbaren Endothel-spezifischen S1P₁ Knockout-Mäusen (S1P₁^{flox/flox}-endSCLcre) liefern wie sie zurzeit im Labor geplant sind. Während für S1P₁ mehrere anti-inflammatorisch wirksame Mechanismen zum tragen kommen könnten, wie dessen inhibitorische Wirkung auf TNF α -induzierte Induktion von Adhäsionsmolekülen und die Reduktion endothelialer Permeabilität¹⁵¹, ist zum hier identifizierten pro-adhäsiven Wirkmechanismus von S1P₃^{-/-} nichts bekannt. Das dieser allerdings existiert, scheint durch die in der Literatur beschriebenen sowohl pro- als auch anti-adhäsiven Effekte von S1P bestätigt zu werden. In der Tat wurde kürzlich vorgeschlagen, dass S1P seinen inhibitorischen Effekt auf die TNF α -induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen über den S1P₁-Rezeptor vermittelt, während es seine in Abwesenheit von TNF α stattfindende Stimulation von Adhäsionsmolekülen über S1P₃ ausübt¹⁵². Als mechanistisch dafür verantwortlich wurden G_{12/13} Proteine vorgeschlagen, an die nur S1P₃ und nicht S1P₁ koppeln¹⁵². Trotz der Attraktivität dieser Hypothese fehlt ihr der kausale Beweis, so dass das Zusammenspiel zwischen S1P₁ und S1P₃ bei der Vermittlung der biologischen Funktionen von S1P weiterhin Gegenstand intensiver Forschung ist. Zusammenfassend lässt sich aus den in dieser Arbeit vorgestellten Daten herleiten, dass S1P₃ sowohl auf Makrophagen als auch auf Endothelzellen die Rekrutierung inflammatorischer Zellen begünstigt und damit der Atherosklerose Vorschub leistet.

Therapeutische Perspektiven einer Modulation des S1P/S1P-Rezeptor-Systems

Die Modulation von S1P-Rezeptoren im Hinblick auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose könnte in Zukunft eine bedeutende Rolle spielen. Allerdings hätte die therapeutische Verwendung von FTY720 immer das Problem der Immunsuppression als Nebenwirkung. Dementsprechend könnten S1P-Agonisten, die speziell nur auf die Gefäße und nicht auf das Immunsystem wirken, oder solche, die lokal mittels eines Stents an ein Gefäß appliziert werden, viel versprechende Ansätze zur Behandlung von Atherosklerose oder Stent-Restenose sein. In anderen Gebieten der Medizin haben S1P-Analoga schon Einzug gehalten: FTY720 wird voraussichtlich im Jahr 2010 als Medikament zur Behandlung von Multipler Sklerose von der U.S.-Amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen werden. Dass die Modulation von S1P-Rezeptoren ein hoch aktuelles und Pharma-relevantes Forschungsgebiet ist, zeigt sich auch daran, dass Firmen wie Merck und Actelion neue spezifischere S1P-Agonisten und -Antagonisten entwickeln, um mögliche neue Anwendungsgebiete zu erschließen. Zu diesen gehören solide Tumoren, Lymphome, Leukämien, Autoimmunerkrankungen, Retinopathien, und Transplantationsmedizin. Da es momentan noch keine verfügbaren spezifischen Antagonisten einzelner S1P-Rezeptoren gibt, wird die mechanistische Erforschung von S1P-Funktionen *in vivo* mittels gewebespezifisch ausgeschalteter S1P-Rezeptoren in Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen vorangetrieben. Dabei kommen auch Modulationen der S1P-Spiegel zum Einsatz. Dieser Ansatz wird vor allem mittels pharmakologischer Mittel verfolgt, da die genetischen Möglichkeiten aufgrund der frühen Letalität der S1P-Lyase- und Sphk1/Sphk2-Doppel-Knockout-Mäuse (und des weitgehend unauffälligen Phänotyps der einzelnen Sphk-Knockouts) relativ eingeschränkt sind. S1P-Spiegel lassen sich pharmakologisch durch den Einsatz von S1P-Lyase-Inhibitoren wie 4-deoxypyridoxine (DOP) und des Lebensmittelfarbstoffs 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole (THI) *in vivo* deutlich anheben. Diese Substanzen liefern lohnende Ansätze für die Untersuchung von Atherosklerose und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen unter erhöhten S1P-Spiegeln.

S1P und HDL-assoziiertes S1P als neue Biomarker kardiovaskulärer Erkrankungen?

In jüngsten Untersuchungen konnte S1P als Bestandteil von menschlichen High-Density Lipoproteinen (HDL) identifiziert werden, der an der Vermittlung einiger ihrer pleiotropen Effekte kausal beteiligt ist.^{23, 153, 154} Den Beweis dafür haben Studien geliefert, in denen die Notwendigkeit funktioneller S1P-Rezeptoren für einzelne HDL-Effekte gezeigt wurde²³. Daher hat unsere Arbeitsgruppe den S1P-Gehalt von HDL als mutmaßliches Qualitätsmerkmal der HDL-Funktionalität vorgeschlagen^{23, 153}. Diese ist bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und koronarer Herzkrankheit (KHK) eingeschränkt¹⁵⁵⁻¹⁵⁷, aber es sind weder die zugrunde liegenden Mechanismen noch die dafür geeigneten Messparameter bekannt bzw. etabliert. Daher werden in unserer Arbeitsgruppe zurzeit klinische Studien durchgeführt, bei denen HDL-gebundenes und HDL-ungebundenes S1P in Patienten mit stabiler KHK, akutem Myokardinfarkt und gesunden Kontrollen bestimmt werden und auf ihre Eignung als neue Biomarker für koronare Herzkrankheit getestet werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein biologisch aktives Sphingolipid, welches grundlegende physiologische Prozesse wie Entzündung, Immunität und Angiogenese reguliert. Zunehmende Beachtung findet S1P neuerdings in der Herz-Kreislauf-Physiologie, wo es direkt oder als Bestandteil von High-Density Lipoproteinen (HDL) die Homöostase des Gefäßendothels, den Gefäßtonus und die kardiale Funktion beeinflusst. S1P vermittelt seine Signalwirkung über fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ($S1P_{1-5}$), die auf kardiovaskulären und hämatopoetischen Zellen unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. Im Plasma zirkuliert S1P als Bestandteil von HDL, wird lokal bei Entzündung freigesetzt, und entfaltet vielfältige biologische Wirkungen auf allen an der Atherosklerose beteiligten Zelltypen. Das macht eine kausale Beteiligung von S1P und seiner Rezeptoren an der Pathogenese der Atherosklerose wahrscheinlich, was zu untersuchen das Ziel der vorgelegten Arbeit war.

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass das oral bioverfügbare S1P-Analog FTY720 die Progression der Atherosklerose im Modell der Apolipoprotein E-defizienten Maus hemmte und die Infiltration der Läsion mit entzündlichen Makrophagen verringerte. Zwei potentiell wichtige Mechanismen wurden dabei *in vitro* identifiziert: 1) FTY720 stimulierte die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen über eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), und 2) es inhibierte die NAD(P)H-Oxidase-vermittelte Produktion des atherogenen Chemokins MCP-1. Bei beiden Prozessen spielte der $S1P_3$ -Rezeptor eine tragende Rolle. Um seine Funktion auf die Atherogenese *in vivo* zu klären, wurde im zweiten Teil der Arbeit eine $ApoE^{-/-}/S1P_3^{-/-}$ Doppel-Knockout-Maus generiert und im Hinblick auf atherosklerotische Läsionsgröße und -Zusammensetzung untersucht. Es zeigte sich eine massive Verringerung des Gehalts an Makrophagen in den Läsionen, was auf eine Funktion von $S1P_3$ bei deren Rekrutierung hindeutete. Dies könnte in der Tat der Fall sein, da in der Arbeit nachgewiesen wurde, dass S1P über den Makrophagen-ständigen $S1P_3$ *in vitro* chemotaktisch wirkt. Auch *in vivo* scheint dies der Fall zu sein, da in einem Modell der akuten Peritonitis $S1P_3$ -defiziente Tiere einen Defekt in der Rekrutierung von Makrophagen ins entzündlich veränderte Peritoneum zeigten. Der Beweis für die Bedeutung des $S1P_3$ auf Makrophagen im

Kontext der Atherosklerose konnte mit Hilfe von S1P₃-hämatopoetischen Chimären geführt werden, die auch einen verringerten Makrophagen-Gehalt ihrer Läsionen aufwiesen. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten herleiten, dass der S1P₃-Rezeptor auf Makrophagen ihre Rekrutierung fördert und so der Atherosklerose Vorschub leistet.

Weitere detaillierte Untersuchungen werden benötigt, um die akuten und chronischen Effekte von S1P auf die Pathogenese der Atherosklerose zu klären. Die Wirkung von S1P₃ und anderer S1P-Rezeptoren in der Atherosklerose muss mittels genetischer und pharmakologischer Ansätze weiter verfolgt werden. Neben der experimentellen Aufklärung mechanistischer Zusammenhänge müssen auch S1P-Plasmaspiegel und die Regulation von S1P-Rezeptoren bei menschlicher Atherosklerose untersucht werden. Diese Erkenntnisse werden die Basis für eine diagnostische oder therapeutische Nutzung bei menschlichen Erkrankungen darstellen. Die Zukunft wird zeigen, ob und für welche kardiovaskulären Krankheitsbilder eine Beeinflussung des S1P/S1P-Rezeptor-Systems therapeutische Vorteile liefert. Die Vielfältigkeit der durch S1P ausgeübten Funktionen rücken es in den Fokus der Entwicklung neuer Pharmaka, deren therapeutische Nutzung gleichzeitig anspruchsvoll und attraktiv sein wird. Dazu werden sowohl Rezeptor-spezifische Agonisten und Antagonisten als auch S1P-Metabolismus-modifizierende Pharmaka gehören. In Anbetracht der Komplexität des Systems wird am ehesten eine individuelle Therapie mit unterschiedlichen Kombinationen von S1P-Agonisten und -Antagonisten Anwendung finden. Gleichzeitig öffnen sich damit gänzlich neue Ansätze und Konzepte zur Behandlung vieler Krankheiten, bei denen S1P eine Rolle spielt.

6 Literatur

1. Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, Dillehay DL, Peng Q, Wang E, Allegood J, Trotman-Pruett S, Sullards MC, Merrill AH, Jr. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2003;47:373-381.
2. Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH, Jr. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:1864-1884.
3. Thudichum J. A treatise on the chemical constitution of the brain. *Bailliere, Tindall, and Cox.* 1884:149.
4. Carter HE, Haines WJ, Ledyard WE, Norris WP. Biochemistry of the sphingolipides: I. preparation of sphingolipids from beef brain and spinal cord. *J Biol Chem.* 1947;169:77-82.
5. Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol.* 1991;114:155-167.
6. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature.* 1993;365:557-560.
7. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 2000;106:951-961.
8. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell.* 1999;99:301-312.
9. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem.* 1999;274:35343-35350.
10. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem.* 2002;277:21453-21457.
11. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science.* 2002;296:346-349.
12. Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, Stainier DY. A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature.* 2000;406:192-195.
13. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2007;316:295-298.
14. Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res.* 2008;102:669-676.
15. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:139-150.
16. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:112-124.
17. Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, Kihara A, Sano T, Igarashi Y, Yamaguchi A. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res.* 2006;47:614-621.

18. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:16394-16399.
19. Lee YM, Venkataraman K, Hwang SI, Han DK, Hla T. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;84:154-162.
20. Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Miura S, Noda K, Okajima F, Saku K. Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis*. 2005;178:199-205.
21. Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*. 2000;352 Pt 3:809-815.
22. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1843-1849.
23. Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res*. 2009;82:201-211.
24. Shaul PW, Mineo C. HDL action on the vascular wall: is the answer NO? *J Clin Invest*. 2004;113:509-513.
25. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001;7:853-857.
26. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004;113:569-581.
27. Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer JR. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1542-1548.
28. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007;8:1295-1301.
29. Rosen H, Sanna G, Alfonso C. Egress: a receptor-regulated step in lymphocyte trafficking. *Immunol Rev*. 2003;195:160-177.
30. Brinkmann V. FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol*. 2009;158:1173-1182.
31. Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15:513-520.
32. Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:743-768.
33. Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science*. 2001;294:1875-1878.
34. Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N, Sakurada S, Usui S, Okamoto H, Matsui O, Takuwa Y. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2002;90:325-332.
35. Allende ML, Proia RL. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:222-227.
36. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*. 2005;25:11113-11121.

37. Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, Yamashita T, Proia RL. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279:29367-29373.
38. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, Sabbadini RA. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell.* 2006;9:225-238.
39. Xie B, Shen J, Dong A, Rashid A, Stoller G, Campochiaro PA. Blockade of sphingosine-1-phosphate reduces macrophage influx and retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.* 2009;218:192-198.
40. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:2016-2026.
41. Tauseef M, Kini V, Knezevic N, Brannan M, Ramchandaran R, Fyrst H, Saba J, Vogel SM, Malik AB, Mehta D. Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circ Res.* 2008;103:1164-1172.
42. Florey O, Haskard DO. Sphingosine 1-phosphate enhances Fc gamma receptor-mediated neutrophil activation and recruitment under flow conditions. *J Immunol.* 2009;183:2330-2336.
43. Milara J, Mata M, Mauricio MD, Donet E, Morcillo EJ, Cortijo J. Sphingosine-1-phosphate increases human alveolar epithelial IL-8 secretion, proliferation and neutrophil chemotaxis. *Eur J Pharmacol.* 2009;609:132-139.
44. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 2009;458:524-528.
45. Ledgerwood LG, Lal G, Zhang N, Garin A, Esses SJ, Ginhoux F, Merad M, Peche H, Lira SA, Ding Y, Yang Y, He X, Schuchman EH, Allende ML, Ochando JC, Bromberg JS. The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2008;9:42-53.
46. Niessen F, Schaffner F, Furlan-Freguia C, Pawlinski R, Bhattacharjee G, Chun J, Derian CK, Andrade-Gordon P, Rosen H, Ruf W. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature.* 2008;452:654-658.
47. McVerry BJ, Garcia JG. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. *Cell Signal.* 2005;17:131-139.
48. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:1871-1879.
49. Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2004;279:20555-20558.
50. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000;289:739-745.
51. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2007;450:383-387.
52. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:321-354.
53. Hla T, Maciag T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 1990;265:9308-9313.

54. Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH. Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J.* 1998;330 (Pt 2):605-609.
55. Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science.* 1998;279:1552-1555.
56. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54:265-269.
57. Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJ, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem.* 2001;276:33697-33704.
58. Zhang G, Contos JJ, Weiner JA, Fukushima N, Chun J. Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene.* 1999;227:89-99.
59. Liu CH, Hla T. The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor edg-1. *Genomics.* 1997;43:15-24.
60. Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood.* 2003;102:3665-3667.
61. Chae SS, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest.* 2004;114:1082-1089.
62. Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest.* 2007;117:2506-2516.
63. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, Lidington D, Bolz SS, Friedman TB, Hla T, Proia RL. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J Biol Chem.* 2007;282:10690-10696.
64. Tolle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schonfelder G, Schafers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, Van der Giet M. Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res.* 2005;96:913-920.
65. Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Murakami M, Okajima F. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1283-1288.
66. Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, Contos JJ, Kingsbury MA, Yang AH, Zhang G, Brown JH, Chun J. Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem.* 2002;277:25152-25159.
67. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation.* 2006;114:1403-1409.
68. Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Seeger F, Aicher A, Urbich C, Spyridopoulos I, Chun J, Brinkmann V, Keul P, Levkau B, Zeiher AM, Dimmeler S, Haendeler J. Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:275-282.
69. Van Brocklyn JR, Graler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood.* 2000;95:2624-2629.

70. Graler MH, Grosse R, Kusch A, Kremmer E, Gudermann T, Lipp M. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J Cell Biochem.* 2003;89:507-519.
71. Wang W, Graeler MH, Goetzl EJ. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *Faseb J.* 2005;19:1731-1733.
72. Matsuyuki H, Maeda Y, Yano K, Sugahara K, Chiba K, Kohno T, Igarashi Y. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol Immunol.* 2006;3:429-437.
73. Glickman M, Malek RL, Kwitek-Black AE, Jacob HJ, Lee NH. Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1. *Mol Cell Neurosci.* 1999;14:141-152.
74. Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch KR. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem.* 2000;275:14281-14286.
75. Novgorodov AS, El-Alwani M, Bielawski J, Obeid LM, Gudz TI. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *Faseb J.* 2007;21:1503-1514.
76. Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 2005;25:1459-1469.
77. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
78. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138:S419-420.
79. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247:349-358.
80. Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:722-726.
81. Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfowitz E, Shay A. Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:167-177.
82. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.
83. Hansson GL, P. The role of the lymphocyte. In: Fuster VR, R. Topol, E., ed. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. New York: Lippincott-Raven; 1996.
84. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
85. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1262-1275.
86. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;421:277-290.
87. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-1374.
88. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1859-1867.
89. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-2503.

90. Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc Res.* 1999;41:369-375.
91. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-3421.
92. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:193-205.
93. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006;98:1352-1364.
94. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95:764-772.
95. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuletic S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp RH, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao XQ, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram JF, Heinecke JW. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007;117:746-756.
96. Rezaee F, Casetta B, Levels JH, Speijer D, Meijers JC. Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics.* 2006;6:721-730.
97. Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582:132-137.
98. Argraves KM, Gazzolo PJ, Groh EM, Wilkerson BA, Matsuura BS, Twal WO, Hammad SM, Argraves WS. High density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate promotes endothelial barrier function. *J Biol Chem.* 2008;283:25074-25081.
99. Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, Ozaki M, Takahashi T, Ogawa W, Inoue N, Yokoyama M. Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:108-114.
100. Alewijnse AE, Peters SL. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both? *Eur J Pharmacol.* 2008;585:292-302.
101. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J.* 2000;348 Pt 1:71-76.
102. Osada M, Yatomi Y, Ohmori T, Ikeda H, Ozaki Y. Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299:483-487.
103. Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest.* 2001;108:689-701.
104. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2001;276:10627-10633.
105. Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, Gamble JR. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood.* 2005;105:3169-3177.
106. Kluk MJ, Hla T. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res.* 2001;89:496-502.
107. Zohlnhofer D, Richter T, Neumann F, Nuhrenberg T, Wessely R, Brandl R, Murr A, Klein CA, Baeuerle PA. Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation. *Mol Cell.* 2001;7:1059-1069.

108. Tosaka M, Okajima F, Hashiba Y, Saito N, Nagano T, Watanabe T, Kimura T, Sasaki T. Sphingosine 1-phosphate contracts canine basilar arteries in vitro and in vivo: possible role in pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke*. 2001;32:2913-2919.
109. Ohmori T, Yatomi Y, Osada M, Kazama F, Takafuta T, Ikeda H, Ozaki Y. Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. *Cardiovasc Res*. 2003;58:170-177.
110. Bischoff A, Czyborra P, Meyer Zu Heringdorf D, Jakobs KH, Michel MC. Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1878-1883.
111. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, Hedrick CC. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res*. 2008;102:950-958.
112. Weigert A, Tzieply N, von Knethen A, Johann AM, Schmidt H, Geisslinger G, Brune B. Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1-phosphate. *Mol Biol Cell*. 2007;18:3810-3819.
113. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb J*. 2008;22:2629-2638.
114. Singer II, Tian M, Wickham LA, Lin J, Matheravidathu SS, Forrest MJ, Mandala S, Quackenbush EJ. Sphingosine-1-phosphate agonists increase macrophage homing, lymphocyte contacts, and endothelial junctional complex formation in murine lymph nodes. *J Immunol*. 2005;175:7151-7161.
115. Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:204-215.
116. Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, Smith WS, Page MT, Young TR, Gleason LA, Nakajima N, Sabbadini RA. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *Am Heart J*. 2003;146:62-68.
117. Foss FW, Jr., Snyder AH, Davis MD, Rouse M, Okusa MD, Lynch KR, Macdonald TL. Synthesis and biological evaluation of gamma-aminophosphonates as potent, subtype-selective sphingosine 1-phosphate receptor agonists and antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2007;15:663-677.
118. Clemens JJ, Davis MD, Lynch KR, Macdonald TL. Synthesis of para-alkyl aryl amide analogues of sphingosine-1-phosphate: discovery of potent S1P receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:3401-3404.
119. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427:355-360.
120. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747.
121. Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;355:1124-1140.
122. Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, Claffey K, Hla T. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem*. 2003;278:47281-47290.
123. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Sasayama S. FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation. *Circulation*. 1999;100:1322-1329.
124. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350.

125. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
126. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol*. 1998;160:5037-5044.
127. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998;97:2494-2498.
128. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001;88:756-762.
129. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:105-128.
130. Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:44-50.
131. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. 2001;104:448-454.
132. Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett*. 2003;554:189-193.
133. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*. 1998;70:2446-2453.
134. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95:858-866.
135. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2:275-281.
136. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:894-897.
137. Wenzel UO, Fouqueray B, Grandaliano G, Kim YS, Karamitsos C, Valente AJ, Abboud HE. Thrombin regulates expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;77:503-509.
138. Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:590-597.
139. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002;91:406-413.
140. Henderson RB, Hobbs JA, Mathies M, Hogg N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*. 2003;102:328-335.
141. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
142. Barringhaus KG, Phillips JW, Thatte JS, Sanders JM, Czarnik AC, Bennett DK, Ley KF, Sarembock IJ. Alpha4beta1 integrin (VLA-4) blockade attenuates both early and late leukocyte recruitment and neointimal growth following carotid injury in apolipoprotein E (-/-) mice. *J Vasc Res*. 2004;41:252-260.
143. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*. 1999;103:773-778.

144. Bolick DT, Srinivasan S, Kim KW, Hatley ME, Clemens JJ, Whetzel A, Ferger N, Macdonald TL, Davis MD, Tsao PS, Lynch KR, Hedrick CC. Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- α -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:976-981.
145. Ley K. Arrest chemokines. *Microcirculation.* 2003;10:289-295.
146. Veillard NR, Steffens S, Burger F, Pelli G, Mach F. Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2339-2344.
147. Zhao L, Ding T, Cyrus T, Cheng Y, Tian H, Ma M, Falotico R, Pratico D. Low-dose oral sirolimus reduces atherogenesis, vascular inflammation and modulates plaque composition in mice lacking the LDL receptor. *Br J Pharmacol.* 2009;156:774-785.
148. Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, Lin CY, Hla T. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem.* 2007;282:9082-9089.
149. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 2000;31:40-47.
150. Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, Ley K, Hedrick CC. Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circ Res.* 2006;99:731-739.
151. Lucke S. Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate. *Cellular Physiology and Biochemistry.* in press.
152. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, Ishizuka T, Sekiguchi A, Ishiwara M, Im DS, Sato K, Murakami M, Okajima F. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006;281:37457-37467.
153. Keul P, Sattler K, Levkau B. HDL and its sphingosine-1-phosphate content in cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007;12:301-306.
154. Okajima F, Sato K, Kimura T. Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I. *Endocr J.* 2009;56:317-334.
155. de Souza JA, Vindis C, Hansel B, Negre-Salvayre A, Therond P, Serrano CV, Jr., Chantepie S, Salvayre R, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis.* 2008;197:84-94.
156. Nobecourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, Kontush A. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia.* 2005;48:529-538.
157. Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, Ip MS. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis.* 2006;184:377-382.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei Prof. Dr. Bodo Levkau für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas, für die exzellente Betreuung während der ganzen Zeit, und für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Außerdem für die vielen langen und bereichernden Diskussionen, die Geduld und fachliche Kompetenz. Sein Einsatz hat eine besondere Atmosphäre geschaffen, die den Zusammenhalt und die Kreativität fördert, und dadurch zum Erfolg führt.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus van der Giet, Charite Berlin, möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Kooperation bedanken.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von Dr. Markus Gräler, Medizinische Hochschule Hannover für die bereitwillige Messung der S1P-Werte in den Exsudaten.

Großer Dank geht an alle Levkau-Sisters. "Susi Sonnenschein" und die "Krasse Karin", mit denen ich Freud und Leid geteilt habe, und ohne die vieles weniger lustig aber auch deutlich weniger erfolgreich gewesen wäre. Sei es mit Diskussionen während Zugfahrten oder am Küchentisch über Faktor X, gemeinschaftlicher Karaoke im Labor und Büro, ohne Euch wär's nur halb so schön. Meinen Hasüüüs "Supa Sina" und "Amazing Agnes", ohne die das Labor wirklich zusammenbrechen würde, und die mit "KayKay Krawall" zusammen das Beste TA Team der Welt bilden. Ohne Eure Hilfe wären viele Experimente nicht möglich gewesen. Wenn einer Hilfe brauchte, waren die anderen da. Ihr alle seid großartig.

An dieser Stelle möchte ich auch allen ehemaligen des Labors Danken, die auch immer ihren Teil zum Erfolg beigetragen haben. Vanessa, die mit ihrer großen Klappe immer für gute Laune gesorgt hat, und Tanja, die die Histologie etabliert, und regelmäßig den Wettbewerb um den schlechtesten Spruch für sich gewinnen konnte.

Ein großes „Danke“ auch an Christian. Du hast mich ertragen wenn ich schlechte Laune hatte, hast meine seltsamen Arbeitszeiten akzeptiert und hattest immer ein offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme des Alltags. Du hast mir den Rücken gestärkt (nicht nur durch den Sport) und mich in allen Angelegenheiten unterstützt. Danke, dass du da bist.

Meine Kleene, meine Lästerschwester, Mitbewohnerin und Seelenverwandte. Du kennst mich besser als jeder andere, und wir verstehen uns ohne Worte. Manchmal ist es schon fast unheimlich. Sogar beim Trivial Pursuit muss ich nicht mal die Frage vorlesen und du kennst schon die Antwort... Vielen Dank das du immer da warst wenn ich jemanden zum Zuhören, Quatschen oder Rat brauchte. Ohne Dich wäre ich nur die Hälfte.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken.

Mama und Papa, ihr habt mich immer unterstützt bei dem was ich machen wollte, und habt mir ermöglicht meinen Traum zu leben. Von klein an habt Ihr mir die Freiheit gegeben selbst Entscheidungen zu treffen (und dafür grade zu stehen). Ihr habt immer zu mir gehalten und mir Rückhalt und Geborgenheit gegeben. Durch euch bin ich das geworden was ich bin und sein wollte. Vielen, vielen Dank dafür. Ich bin stolz das ihr meine Eltern seit.

Lebenslauf

Name: Petra Keul
Geburtsdatum: 19.09.1977
Geburtsort: Bonn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Behrenstr. 35
40233 Düsseldorf
Telefon / Telefax: (0211) 2203380
E-mail-Adresse: petra.keul@uni-due.de

Schulbildung:

1984-1988 Paul-Gerhard Grundschule Euskirchen
1988-1997 Emil Fischer-Gymnasium Euskirchen
1997 Abitur

Studium:

1997-2003 Diplomstudiengang Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms
Universität Bonn
Schwerpunkte: Molekularbiologie and Immunbiologie
2002-2003 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Physiologie und
Entwicklungsbiologie Abt. für Immunbiologie, Universität Bonn
Titel: *Splice Varianten von BAT2 und BAT3 und die Herstellung einer
BAT3-MBP Fusionsproteins.*

Berufliche Tätigkeit:

2004-2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für
Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Münster
2007 Beginn der Promotion am Institut für Pathophysiologie,
Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen
Titel der Promotionsarbeit: *Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat
Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose*

Vorträge:

- 2005 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Atheroskleroseforschung, Blaubeuren.
Titel: *Der Immunsuppressor FTY720 induziert eNOS-abhängige
arterielle Vasodilatation über den Lysophospholipid-Rezeptor S1P₃*
- 2005 Molecular Imaging Summer School Kolymbari, Kreta, Greece
Titel: *Isatin-based caspase inhibitors as novel PET-compatible
radioligands for
molecular imaging of apoptosis in vivo*
- 2006 Young Investigator Award session at the annual meeting of the Society
of Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB), München
Titel: *HDL and their constituent S1P protect against myocardial
infarction via the S1P₃ sphingolipid receptor*
- 2006 Young excellence in cardiovascular Imaging session at the Imaging
Visions 2006, Nordrhein-Westfälische Akademie der Wissenschaften,
Düsseldorf
Titel: *Quantitative Micro-CT imaging of atherosclerotic plaques in
ApoE^{-/-} mice: Correlation with histomorphometry at anatomically
defined sites*
- 2007 EMIL / DiMI Annual Meeting, Naples, Italy
Titel: *Multimodal imaging of atherosclerosis: an micro-CT/small animal
PET/histology approach ex vivo*
- 2007 Keystone Symposium C2 "Bioactive Lipids in the Lipidomics Era",
Taos, New Mexico, USA
Titel: *The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces
atherosclerosis in ApoE deficient mice*
- 2007 American Heart Association Scientific Sessions 2007, Orlando, USA
Titel: *The sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P₃) governs
macrophage recruitment to atherosclerotic lesions and inflammation
sites*
- 2008 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Atheroskleroseforschung, Blaubeuren, Germany
Titel: *Quantitative Micro-CT and PET-CT imaging of atherosclerotic
plaque activity, volume and morphology in ApoE-deficient mice:
"Perfect match correlation" of metabolic activity, structural
characteristics and histomorphometry at anatomically defined sites*

2009 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, Germany
Titel: *Deletion of sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P3) attenuates macrophage-driven inflammation in atherosclerotic lesions of S1P3/ApoE double knockout mice*

Poster presentations:

2005 XXVII Congress of the European Society of Cardiology, Stockholm, Sweden
Titel: *The Sphingosine-1-phosphate analog FTY720 induces eNOS activation and vasodilation*

2005 Symposium of the Interdisciplinary Center of Clinical Research (IZKF) Münster, Germany
Titel: *Molecular imaging of apoptosis in vivo by small molecular PET-compatible caspase inhibitors*

2006 Keystone Symposium Z2 Molecular Biology of the Vasculature, Keystone CO, USA
Titel: *Isatin-based Caspase inhibitors as novel PET-compatible radioligands for molecular imaging of apoptosis in vivo*

2006 5th Annual Meeting of the Society for Molecular Imaging (SMI), Hawaii, USA
Titel: *Quantitative Micro-CT imaging of atherosclerotic plaque area and morphology in ApoE-deficient mice: Correlation with histomorphometry at anatomically defined sites.*

2006 XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy
Titel: *HDL and their constituent S1P acutely protect against myocardial infarction in vivo via the S1P3 sphingolipid receptor*

2006 XIV International Vascular Biology Meeting, Noordwijkerhout, The Netherlands
Titel: *Isatin-based caspase inhibitors as novel PET-compatible radioligands for molecular imaging of apoptosis in vivo*

2006 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, Germany
Titel: *Caspase inhibitors as novel PET-compatible radioligands for molecular imaging of apoptosis in vivo*

- 2007 XXIX Congress of the European Society of Cardiology, Vienna, Austria
Titel: *The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice*
- 2007 XIX world Congress of the International Society for Heart Research, Bologna, Italy
Titel: *Sphingosine-1-phosphate (S1P) protects against myocardial infarction in vivo*
- 2007 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, Germany
Titel: *The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice*
- 2007 Keystone Symposium C2 "Bioactive Lipids in the Lipidomics Era", Taos, New Mexico, USA
Titel: *The sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P₃) governs macrophage recruitment to atherosclerotic lesions and inflammation sites*
- 2007 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Atheroskleroseforschung, Blaubeuren, Germany
Titel: *The sphingosine-1-phosphate analogue and immunosuppressant FTY720 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice*
- 2008 Keystone Symposium J4 "Lymphocyte Trafficking, Keystone, USA
Titel: *The Sphingosine-1-phosphate Receptor 3 (S1P₃) Governs Macrophage Recruitment To Atherosclerotic Lesions And Inflammation Sites*
- 2008 3rd Joint Meeting of the Fench, German and Swiss Atherosclerosis Societies, St. Gervais, France
Titel: *The Sphingosine-1-phosphate Receptor 3 (S1P₃) Governs Macrophage Recruitment To Atherosclerotic Lesions And Inflammation Sites*
- 2008 6th Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology Groups, Amsterdam, The Netherlands
Titel: *The Sphingosine-1-phosphate Receptor 3 (S1P₃) Governs Macrophage Recruitment To Atherosclerotic Lesions And Inflammation Sites*
- 2009 Keystone Symposium J8 "Dissecting the Vasculature: Function, Molecular Mechanisms and Malfunction", Vancouver, Canada
Titel: *Deletion of sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P₃) attenuates macrophage-driven inflammation in atherosclerotic lesions of S1P₃/ApoE double knockout mice*

2009 FASEB Summer Research Conferences : "Lysophospholipid Mediators in Health and Disease", Carefree, Arizona, USA
 Titel: *Deletion of sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P3) attenuates macrophage-driven inflammation in atherosclerotic lesions of S1P3/ApoE double knockout mice*

Preise:

2007 Preis der Dr. H.-H Deichmann Stiftung
 "Basic research in Pathophysiology"

2008 Poster Award of the 3rd joint annual meeting of the French, German and Swiss Atherosclerosis Societies, St. Gervais, Frankreich

2009 Hannelore Stübler-Preis

Publikationen:

1. Tölle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, von Wnuck Lipinski K, Schönfelder G, Schäfers M, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, Giet Mvd. The immunosuppressant FTY720 induces eNOS-dependent arterial vasodilation via the lysophospholipid receptor S1P3. **Circ Res.** **2005**;96:913-20
2. Stegger L, Schafer KP, Fogel U, Livieratos L, Hermann S, Jacoby C, Keul P, Conway EM, Schober O, Schrader J, Levkau B, Schafer M. Monitoring Left Ventricular Dilation in Mice with PET. **J Nucl Med.** **2005**;46:1516-21.
3. Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Schmid C, Schmid KW, Keul P, Takeda A, Weis S, Levkau B, Baba HA. Reverse remodeling following insertion of left ventricular assist devices (LVAD): A review of the morphological and molecular changes. **Cardiovasc Res.** **2005**;68(3):376-8
4. Von Wnuck Lipinski K, Keul P, Ferri N, Lucke S, Heusch G, Fischer J W, Levkau B. Integrin-mediated transcriptional activation of Inhibitor of Apoptosis Proteins protects smooth muscle cells against apoptosis induced by degraded collagen. **Circ Res.** **2006**;98(12):1490-7.
5. Von Wnuck Lipinski K, Keul P, Lucke S, Heusch G, Wohlschlaeger J, Baba H, Levkau B. Degraded collagen induces calpain-mediated destruction of XIAP and apoptosis in human vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res.** **2006**;69(3):697-705
6. Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafer M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. **Circulation.** **2006**;114(13):1403-9.
7. Kopka K, Faust A, Keul P, Wagner S, Breyholz H-J, Hölte C, Schober O, Schäfers M, Levkau B. 5-Pyrrolidinylsulfonyl isatins as a potential tool for the molecular imaging of caspases in apoptosis. **J Med Chem** **2006**;49: 6704-6715.

8. Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Seeger F, Aicher A, Urbich C, Spyridopoulos I, Chun J, Brinkmann V, Keul P, Levkau B, Zeiher AM, Dimmeler S, Haendeler J. Sphingosine-1-Phosphate Stimulates the Functional Capacity of Progenitor Cells by Activation of the CXCR4-Dependent Signaling Pathway via the S1P3 Receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2007;27(2):275-82
9. Faust A, Wagner S, Keul P, Law MP, Hermann S, Schnöckel U, Schober O, Schäfers M, Levkau B, Kopka K. The nonpeptidyl Caspase binding Radioligand (S)-1-(4-(2-[18F]Fluoroethoxy)-benzyl)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin ([18F]CbR) as potential PET-compatible apoptosis imaging agent. **Q J Nucl Med Mol Imaging.** 2007;51(1):67-73
10. Keul P, Tolle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. The Sphingosine-1-Phosphate Analogue FTY720 Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2007 ;27(3):607-13.
11. Keul P, Sattler K, Levkau B. HDL and its sphingosine-1-phosphate content in cardioprotection. **Heart Fail Rev.** 2007;12(3-4):301-6.
12. Sensken S-C; Stäubert C; Keul P; Levkau B; Schöneberg T; Gräler MH. Selective activation of G alpha i mediated signalling of S1P3 by FTY720-phosphate **Cellular Signalling** 2008; 20(6):1125-33
13. Levkau B; Schäfers M; Wohlschlaeger J; von Wnuck Lipinski K; Keul P; Hermann S; Kawaguchi N; Kirchof P; Fabritz L; Stypmann J; Stegger L; Flögel U, Schrader J, Fischer J; Hsieh P; Ou Y-L; Mehrhof F; Tiemann K; Ghanem A; Matus M; Neumann J; Heusch G; Schmid K W; Conway E M, Baba H A. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. **Circ.** 2008; 25;117(12):1583-93
14. Tölle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge U J, Levkau B, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, van der Giet M and Nofer J-R. HDL-associated lysophospholipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production in vascular smooth muscle cells. **ATVB** 2008; 28(8):1542-8

Publizierte Abstracts:

1. Faust A, Keul P, Schober O, Levkau B, Schäfers M, Kopka K. Methoxymethylpyrrolidinyl-sulfonylisatins: Putative Nonpeptidyl Caspase Binding Radioligands. **Mol. Img.** 2005;4:344.
2. Faust A, Wagner S, Keul P, Schober O, Levkau B, Schäfers M, Kopka K. The Caspase inhibitor (S)-[1-methyl-11C]-1-methyl-5-[1-(2-phenoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin: a putative nonpeptidyl Caspase binding radioligand. **J Label Compd Radiopharm** 2005;48(S1):S284.
3. Kopka K, Faust A, Wagner S, Breyholz HJ, Keul P, Schober O, Schäfers M, Levkau B. The nonpeptidyl Caspase binding Radioligand (S)-1-(4-(2-[18F]Fluoroethoxy)-benzyl)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)-sulfonyl]isatin ([18F]CbR) as potential PET-compatible apoptosis imaging agent. **Mol Imaging** 2006; 50(Suppl.1 to issue No. 1):7-8.

4. Keul P, Tölle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. *The sphingosine-1-phosphate analogue and immunosuppressant FTY720 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice.* **Perfusion** 2007 20: 75
5. Keul P, Tölle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. *The sphingosine-1-phosphate analogue and immunosuppressant FTY720 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice.* **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 2007
6. Keul P, Tölle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. *The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice.* **European Heart Journal**, 2007 Vol. 28, Abstract Suppl.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Petra Keul befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden